

GIOVANNA DA SILVA ROCHA

**AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- ENTEROTOXINA
ESTAFILOCÓCICA A EM ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO**

Botucatu

2023

GIOVANNA DA SILVA ROCHA

**AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- ENTEROTOXINA
ESTAFILOCÓCICA A EM ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à saúde humana e animal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ivana Cesarino Leão

Botucatu

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Rocha, Giovanna da Silva.

Avaliação da imobilização de anticorpos
anti-enterotoxina estafilocócica A em óxido de grafeno
reduzido / Giovanna da Silva Rocha. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Ivana Cesarino Leão

Capes: 30000009

1. Enterotoxinas. 2. Nanotecnologia. 3. Óxido de
grafeno. 4. Staphylococcus aureus. 5. Anticorpos.

Palavras-chave: Enterotoxina A; Imunossensor;
Nanotecnologia; Óxido de grafeno reduzido.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação Da Imobilização de Anticorpos Anti-Enterotoxina Estafilocócica A Em Óxido De Grafeno Reduzido

AUTORA: GIOVANNA DA SILVA ROCHA

ORIENTADORA: IVANA CESARINO LEÃO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:

Prof.^a Dr.^a IVANA CESARINO LEÃO (Participação Presencial)

Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu - UNESP

Profa. Dra. CARLA DOS SANTOS RICCARDI (Participação Presencial)

Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agrônomicas - FCA/Botucatu - Unesp

Prof. Dr. RAFAEL PLANA SIMÕES (Participação Presencial)

Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agrônomicas - UNESP - Câmpus de Botucatu

Botucatu, 29 de março de 2023

Documento assinado digitalmente
 MARIA VICTÓRIA RAMALHO DA CUNHA
Data: 05/04/2023 09:29:03-0300
Verifique em <https://validar.itb.gov.br>

Maria Victória Ramalho da Cunha
Assistente Administrativo II da Seção Técnica de Pós-Graduação
Instituto de Biociências de Botucatu

À Santíssima Trindade e
à minha família.

AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar, por estar comigo o tempo todo.

À minha família pelo incentivo em realizar a pós-graduação.

À Prof.^a Dr.^a Ivana, pela amizade, orientação, conselhos, ensinamentos, paciência e exemplo como pessoa e profissional, da qual admiro muito e tenho como inspiração de vida.

Aos amigos que estiveram comigo durante essa jornada.

À todos os meus parceiros de laboratório do Laboratório de Eletroanalítica e Nanotecnologia (LEN), e em especial ao Martin por ter me auxiliado e apoiado desde o começo.

À todos os professores e funcionários da IBB-UNESP.

Ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UNESP Botucatu.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Que deseja a alma com mais veemência do que a verdade?”

Santo Agostinho

RESUMO

O óxido de grafeno reduzido (rGO) é um material alótropo de carbono que apresenta características estruturais que o torna uma alternativa relevante como suporte de imobilização de anticorpos para a construção de biossensores. A estratégia de construção de imunossensores deve levar em consideração as características da superfície do transdutor (rGO), assim como a do componente biológico (antígeno/anticorpo) imobilizado no material de suporte, principalmente para a manutenção da atividade imunológica dos mesmos juntamente a sua especificidade. Neste trabalho, foram avaliados diferentes métodos de imobilização do anticorpo anti-Enterotoxina Estafilocócica A (anti-SEA), com o intuito de construir um imunossensor para detecção da SEA em amostras de leite. A SEA é uma toxina secretada por *Staphylococcus aureus* que está associada a intoxicações alimentares decorrentes da ingestão de alimentos contaminados por essa bactéria. Desta forma, utilizando eletrodos de carbono vítreo modificados com rGO e com os agentes de bioconjugação *pireno-NHS* e *EDC-NHS* avaliou-se a capacidade de imobilização do anticorpo anti-SEA na superfície do transdutor. A caracterização eletroquímica dos biossensores foi realizada utilizando as técnicas de Voltametria Cíclica (CV), no intervalo de potencial de - 0,3 V a + 0,9 V vs. Ag/AgCl com velocidade de varredura de 0,1 V s⁻¹ e por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS), com frequência variante do espectro de 10⁵ a 10¹ Hz e 5 mV de amplitude. Ambas as técnicas foram realizadas em uma solução 0,1 PBS (pH 7,0) contendo 0,1 mol L⁻¹ KCl e 5,0 mmol L⁻¹ da sonda redox [Fe(CN)₆]^{3-/4-}. Assim, comparou-se três métodos de imobilização: 1) Adsorção física; 2) Bioconjugação com *pireno-NHS* e 3) Bioconjugação com *EDC-NHS*. Os resultados evidenciaram que, apesar dos agentes de bioconjugação serem vantajosos para auxiliar na imobilização orientada, para o anticorpo estudado o método adsorptivo teve um melhor desempenho. Dessa forma, a utilização do rGO se apresenta como uma alternativa vantajosa ao processo de construção de biossensores eletroquímicos, evidenciando o potencial de aplicação em escala industrial em imunossensores, visto que a manutenção da estabilidade e atividade dos anticorpos imobilizados na superfície do rGO sem a utilização de agentes de imobilização implicam na redução de etapas e de custo na fabricação do imunossensor.

Palavras-chave: Óxido de grafeno reduzido. Enterotoxina A. Imunossensor. Nanotecnologia.

ABSTRACT

Reduced graphene oxide (rGO) is an allotrope carbon derived material that presents structural characteristics that make it a relevant alternative as an antibody immobilization support for the construction of biosensors. The construction strategy of immunosensors must consider the characteristics of the transducer surface (rGO), as well as the biological component (antigen/antibody) immobilized on the support material, mainly for the maintenance of their immunological activity together with their specificity. In this work, different methods of immobilization of the anti- Staphylococcal Enterotoxin A (anti-SEA) antibody were evaluated, with the aim of building an immunosensor to detect SEA in milk samples. SEA is a toxin secreted by *Staphylococcus aureus* that is associated with food intoxication. Thus, using glassy vitreous carbon (GC) electrodes modified with rGO and with the bioconjugation agents pyrene- NHS and EDC-NHS, the immobilization capacity of the anti-SEA antibody on the surface of the transducer was evaluated. The electrochemical characterization of the biosensors was performed using Cyclic Voltammetry (CV) techniques, in the potential range from -0.3 V to +0.9 V vs. Ag/AgCl with a sweep speed of 0.1 V s^{-1} and by Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS), with a frequency varying from 10^5 to 10^1 Hz and 5 mV of amplitude. Both techniques were performed in a 0.1 PBS solution (pH 7.0) containing 0.1 mol L^{-1} KCl and 5.0 mmol L^{-1} of the redox probe $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Thus, three methods of immobilization were compared: 1) Physical adsorption; 2) Bioconjugation with Pyrene-NHS and 3) Bioconjugation with EDC-NHS. The results showed that the adsorptive method was more advantageous for the immobilization of anti-SEA on rGO. Thus, the use of rGO presents itself as an advantageous alternative to the construction process of electrochemical biosensors, showing the potential for application on an industrial scale in immunosensors, since the maintenance of the stability and activity of antibodies immobilized on the surface of rGO without the use of immobilization agents imply in the reduction of steps and cost in the manufacture of the immunosensor.

Keywords: Reduced graphene oxide. Enterotoxin A. Immunosensor. Nanotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura e grupamentos funcionais do GO e rGO.	16
Figura 2 - Quantidade de trabalhos científicos referentes ao uso do grafite e seus derivados publicados na base de dados Scopus entre 2007 e 2019.....	17
Figura 3 - Estrutura geral dos anticorpos.....	19
Figura 4 - Modificação do eletrodo GC com rGO.....	30
Figura 5 - Modificação do eletrodo GC com rGO/pireno-NHS	31
Figura 6 - Modificação do eletrodo GC com rGO/EDC-NHS	32
Figura 7 - Micrografia FEG-SEM do GO	33
Figura 8 - Micrografia FEG-SEM do Óxido de Grafeno Reduzido	34
Figura 9 - Voltamogramas Cíclicos dos eletrodos GC, GC/GO e GC/rGO	35
Figura 10 - Espectros de Raman para rGO e GO	36
Figura 11 - Espectros UV-Vis GO e rGO	37
Figura 12 - Caracterização CV do eletrodo (I) modificado com rGO	38
Figura 13 - Caracterização CV do eletrodo (II) modificado com rGO.....	39
Figura 14 - Diagrama de Nyquist do eletrodo I modificado com rGO.....	40
Figura 15- Diagrama de Nyquist do eletrodo II modificado com rGO.....	41
Figura 16 - Caracterização CV do eletrodo (I) modificado com rGO e pireno-NHS.....	43
Figura 17 - Caracterização CV do eletrodo (II) modificado com rGO e pireno-NHS.....	44
Figura 18 - Diagrama de Nyquist do eletrodo I modificado com rGO e pireno-NHS.....	45
Figura 19 - Diagrama de Nyquist do eletrodo II modificado com rGO e pireno-NHS.....	46
Figura 20 - Caracterização CV para o eletrodo (I) modificado com rGO, EDC-NHS, anti-SEA e SEA	47
Figura 21 - Caracterização CV para o eletrodo (II) modificado com rGO, EDC-NHS, anti-SEA e SEA	48
Figura 22 - Diagrama de Nyquist do eletrodo I modificado com rGO e EDC-NHS.....	49
Figura 23 - Diagrama de Nyquist do eletrodo II modificado com rGO e EDC-NHS.....	50
Figura 24 - Caracterização CV para o eletrodo modificado com rGO	52
Figura 25 - Diagrama de Nyquist de eletrodo modificado com rGO.....	53
Figura 26 - Relação entre a variação de R_{ct} e a concentração de anti-SEA	55
Figura 27 - Diagrama de Nyquist com medições sucessivas do anticorpo.....	56
Figura 28 - Gráfico de R_{ct} em função da concentração de SEA	57
Figura 29 - Diagramas de Nyquist para diferentes concentrações de SEA	58
Figura 30 - Diagramas de Nyquist para diferentes concentrações de SEA em amostras de leite	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Potenciais de redução e oxidação dos eletrodos modificados com rGO, anti-SEA e SEA.....	39
Tabela 2- R_{ct} e R_s dos eletrodos modificados com rGO, anti-SEA e SEA.....	42
Tabela 3- Potenciais de redução e oxidação dos eletrodos modificados com rGO, pireno-NHS, anti-SEA e SEA.....	44
Tabela 4- R_{ct} e R_s dos eletrodos modificados com rGO, pireno-NHS, anti-SEA e SEA	46
Tabela 5- Potenciais de redução e oxidação dos eletrodos modificados com rGO, anti-SEA e SEA.....	48
Tabela 6- R_{ct} e R_s dos eletrodos modificados com rGO termicamente reduzido, EDC-NHS, anti-SEA e SEA.	49
Tabela 7- Potenciais de redução e oxidação dos eletrodos modificados com rGO, anti-SEA e SEA.....	53
Tabela 8- Comparação dos limites de detecção entre biossensores para SEA.....	54
Tabela 9 - Comparação dos limites de detecção entre biossensores para SEA.....	59
Tabela 10 - Resposta do imunossensor em amostras de leite pasteurizado.....	60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	GRAFENO.....	
1.2	BIOSSENSORES E ANTICORPOS	17
1.3	IMOBILIZAÇÃO DE ANTICORPOS	19
1.4	ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS.....	21
1.5	MÉTODOS DE DETECÇÃO DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS.....	23
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	26
3.1	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	26
3.2	INSTRUMENTAÇÃO.....	26
3.3	SÍNTESE DO ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO (RGO).....	27
3.4	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO GO E RGO	27
3.5	ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	27
3.6	CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO GO E RGO	27
3.7	LIMPEZA DOS ELETRODOS DE CARBONO VÍTREO	28
3.8	PREPARAÇÃO DOS ELETRODOS DE TRABALHO	28
3.8.1	Eletrodo GC modificado com rGO.....	29
3.8.2	Eletrodo GC modificado com rGO/pireno-NHS.....	30
3.9.3	Eletrodo GC modificado com rGO/EDC-NHS.....	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	32
4.1	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO GO E RGO.....	32
4.2	CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO GO E RGO.....	34
4.2.1	VOLTAMETRIA CÍCLICA.....	34
4.3	ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	35
4.4	CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS.....	37
4.5	CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS ELETRODOS MODIFICADOS	38
4.5.1	ELETRODO GC MODIFICADO COM RGO	38
4.5.2	ELETRODO GC MODIFICADO COM RGO/PIRENO-NHS.....	42
4.5.3	ELETRODO GC MODIFICADO COM RGO/EDC-NHS.....	47
4.6	AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE ANTI-SEA EM RGO.....	51
4.7	ESTUDO DA ESTABILIDADE DO ANTICORPO SOB A SUPERFÍCIE DO ELETRODO APÓS MEDIDAS SUCESSIVAS DE EIS.....	54
4.8	CURVAS ANALÍTICAS DA ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA A.....	56
4.9	APLICAÇÃO DO IMUNOSENSOR EM AMOSTRAS DE LEITE	59
5	CONCLUSÃO	61

1 INTRODUÇÃO

O óxido de grafeno reduzido (rGO) é um material derivado do grafeno, um dos alótropos sintéticos de carbono. O rGO apresenta características estruturais que o torna uma alternativa viável como suporte para imobilização de moléculas biológicas (ou biomoléculas) (HIRSCH, 2010; TARCAN, 2019). As biomoléculas possuem uma ampla variedade de aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica, agrícola, ambiental, entre outras, e têm sido de grande relevância para o aprimoramento de processos industriais, na criação de novos produtos e serviços, contribuindo para o desenvolvimento da biotecnologia. Contudo, a funcionalidade dessas biomoléculas depende de sua integridade, que pode ser afetada negativamente pelas condições ambientais em que se encontram. Como exemplo, a instabilidade de proteínas, como enzimas e anticorpos, que apresentam redução de seu potencial de aplicação e performance quando externas ao ambiente fisiológico (CHAUDHARY, 2021).

Nesse contexto, o uso de biomoléculas para a construção de biossensores contribui para tornar tais dispositivos uma alternativa vantajosa frente a métodos de diagnósticos *in vitro* tradicionais. Possuindo características tidas como mais vantajosas no que tange sensibilidade, especificidade, facilidade operacional e tempo de detecção se comparado aos métodos tradicionais (MOREIRA, 2017), os biossensores auxiliam na detecção de analitos de interesse, como por exemplo antibióticos (SILVA, 2018), pesticidas em efluentes (SILVA, 2018) e até mesmo de vírus em amostras de saliva (ZACCARIOTO, 2021).

Contudo, a manutenção da estabilidade e atividade dessas biomoléculas é de extrema importância para que seja mantida sua funcionalidade. Logo, a imobilização de biomoléculas em suportes que possuam propriedades físico-químicas favoráveis à natureza da interação entre elas e o suporte é fundamental. Desse modo, é possível mantê-las funcionais, contribuindo para sua performance, quaisquer sejam suas aplicações (CHAUDHARY, 2021).

Os anticorpos (ou imunoglobulinas) são glicoproteínas com elementos de reconhecimento altamente específicos dos denominados antígenos. Devido a sua especificidade, alta reprodutibilidade e sensibilidade de detecção, os anticorpos têm sido amplamente utilizados em imunodiagnósticos (SHARMA, 2016). Considerando a existência de grupos funcionais reativos nos anticorpos e no material de suporte das biomoléculas, características como a estabilidade mecânica do suporte, não-toxicidade, baixo custo e hidrofiliabilidade são de suma importância para a seleção do material (CHAUDHARY, 2021).

No contexto da construção de imunossensores, ou seja, biossensores que utilizam

anticorpos ou antígenos para conversão do sinal biológico para um sinal mensurável, visou-se investigar a utilização de rGO na imobilização de anticorpos por meio de interações não-covalentes e covalentes. Uma vez que o rGO apresenta grupamentos de oxigênio residuais, natureza hidrofílica e constitui dispersões estáveis, este material torna-se uma alternativa com amplo potencial de aplicação, fácil obtenção, baixo custo e também é *environmentally friendly*. Do ponto de vista econômico, tecnológico e industrial, dependendo do método de imobilização utilizado, emprega menos etapas no processo e menos demanda de mão-de-obra especializada, impactando no preço final do produto. (ROWLEY- NEALE, 2018).

Portanto, ao avaliar e comparar diferentes estratégias de imobilização de anticorpos em suportes, busca-se a manutenção e especificidade da atividade imunológica dos anticorpos empregados. Assim como as características da superfície do transdutor e do componente biológico (SHARMA, 2016). Neste trabalho foi avaliada a imobilização covalente e não-covalente de anticorpos anti Enterotoxina Estafilocócica A (anti-SEA), de um imunossensor para detecção da SEA em amostras de leite contaminadas. A SEA é uma toxina secretada por *Staphylococcus aureus* e está associada às doenças transmitidas por alimentos (DTAs), causando intoxicações alimentares (BALABAN; RASOOLY; 2000).

1.1 GRAFENO

O grafeno é um alótropo sintético de carbono que apresenta uma estrutura laminar plana constituída por uma monocamada basal de carbono com hibridização sp^2 hexagonal. As fortes ligações planares σ conferem propriedades elétricas, enquanto as ligações π conferem propriedades mecânicas. Tais ligações favorecem a condutividade térmica e elétrica, elasticidade, resistência e reatividade desse material com outras substâncias químicas. Desse modo, conferem a ele características únicas e vantajosas que o tornam uma alternativa relevante em diversas aplicações (TARCAN, 2019).

Contudo, a alotropia do carbono favorece a aglomeração entre as folhas individuais que compõem o grafeno devido às fortes interações π - π e interações de van der Waals nelas existentes, o que altera as propriedades intrínsecas à ele que são requeridas para sua aplicação em diversas áreas, incluindo a da eletroquímica e biossensores (LI, 2008). Logo, processos físicos e/ou químicos são necessários para o controle de sua reaglomeração e dispersão, como também para melhorar sua sensibilidade quando aplicado aos biossensores.

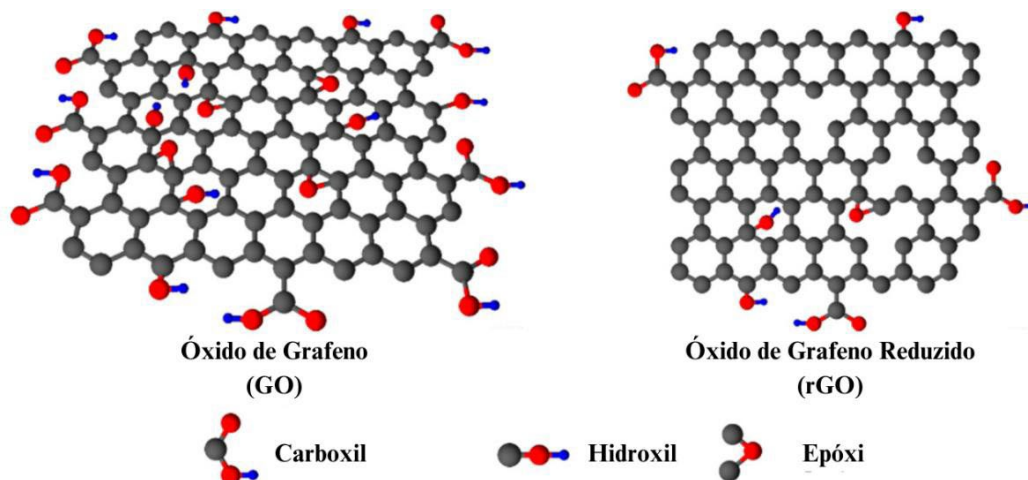
A obtenção do grafeno em escala industrial de modo a manter um alto padrão de qualidade e baixo custo é um desafio atualmente (TARCAN, et al. 2020). Logo, a utilização

de seus derivados como óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno reduzido (rGO) torna-se uma alternativa mais vantajosa. A obtenção do GO permite que seja mantida a estrutura 2D cristalina do grafeno, sendo possível obtê-lo diretamente do grafite com métodos de esfoliação química e mecânica, implicando em uma obtenção mais rápida e menos dispendiosa comparada a do grafeno (TARCAN, et al. 2020). Além disso, o GO pode ser disperso em água e ter uma significativa melhora de suas propriedades a partir da introdução de grupos funcionais contendo oxigênio (YU, et al. 2020). Contudo, o uso de fortes agentes oxidantes afeta a condutividade desse material, resultando em defeitos estruturais que limitam sua aplicação (ROWLEY- NEALE, et al. 2018).

Como uma alternativa ainda mais barata, de fácil obtenção, derivada do GO, recuperando e melhorando as propriedades vantajosas do mesmo, o rGO tem sido utilizado em diversas aplicações. De biossensores a baterias, passando por ferramentas de biorremediação, catalisadores, dispositivos ópticos e flexíveis, membranas, supercapacitores, anti-corrosivos e lubrificantes, tais aplicações demonstram o quanto esse material é promissor (ROWLEY-NEALE, et al. 2018). Sua obtenção é comumente feita por métodos químicos e térmicos, assim como também pode ser micro-ondas ou fotoassistida.

No método químico, empregam-se reagentes como hidrazina e seus derivados ou borohidreto de sódio, sendo que a redução é baseada na troca de elétrons entre o GO e o eletrodo. Já no método térmico, a passagem de CO ou CO₂ gasoso remove grupos funcionais de oxigênio do material (PEI; CHENG; 2012). As propriedades de absorção e de solubilidade do rGO em solventes de interesse contribuem para suas diversas aplicações, incluindo sua utilização como suporte de imobilização de biomoléculas. Na Figura 1 é possível observar as diferenças estruturais entre o GO e o rGO, bem como os grupamentos funcionais presentes e ausentes em cada um deles (STYLIANAKIS, 2019).

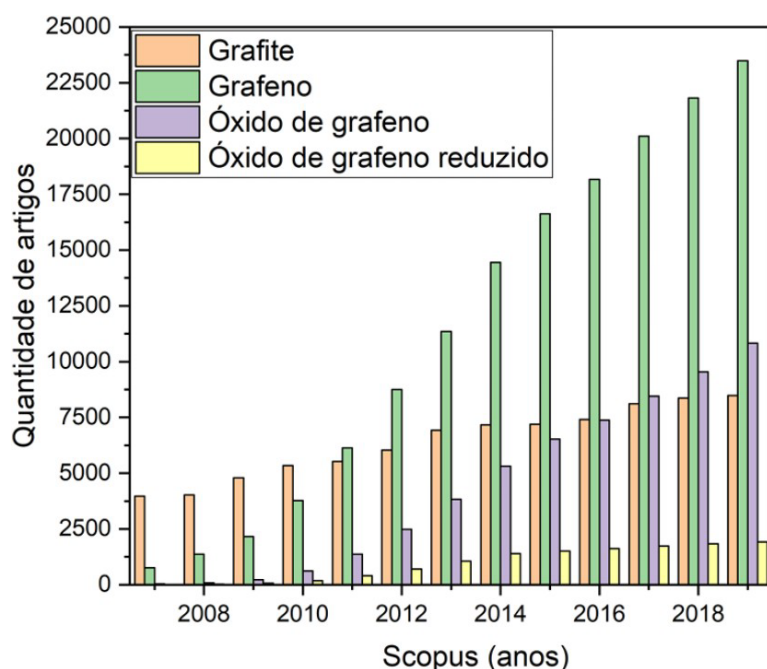
Figura 1 - Estrutura e grupamentos funcionais do GO e rGO



Fonte: Adaptado de Stylianakis et al (2019)

O grafeno tornou-se um dos materiais mais promissores no desenvolvimento de novos dispositivos eletroquímicos, sendo amplamente empregado na construção de biossensores (ROWLEY-NEALE, 2018). Avaliando a quantidade de trabalhos científicos publicados envolvendo grafeno, óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido nas mais diversas aplicações, apresentados na Figura 2, observa-se um crescimento exponencial do número de pesquisas realizadas no período de 2007 a 2019 envolvendo o grafeno e seus derivados (SILVA FILHO, 2020).

Figura 2 - Quantidade de trabalhos científicos referentes ao uso do grafite e seus derivados publicados na base de dados Scopus entre 2007 e 2019



Fonte: Adaptado de SILVA FILHO (2020)

Uma das possíveis justificativas para a grande diferença entre o volume de produções envolvendo grafeno e rGO é a recente descoberta do rGO frente aos outros materiais derivados do carbono. Desse modo, a realização de pesquisas científicas para ampliar a sua aplicação em outras áreas é de suma importância. Logo, o presente trabalho contribui para explorar a utilização do rGO na área de biossensores eletroquímicos baseados em anticorpos.

1.2 BIOSSENSORES E ANTICORPOS

Biossensor pode ser definido como um sensor que se utiliza de materiais biológicos, tais como enzimas, anticorpos, células, tecidos, entre outros, que são conectados a um dispositivo capaz de traduzir um sinal biológico em elétrico (MELO, 2016). Como os biossensores utilizam-se de moléculas biológicas e suas funcionalidades, tem-se então a possibilidade de escolher as mais variadas moléculas para se ligar nos analitos de interesse de acordo com sua afinidade (MOREIRA, 2017). Para a construção de um biossensor, é necessária a imobilização do material biológico em uma superfície, que depende das características desse material empregado para a interação com o analito de interesse (RICCI, 2012).

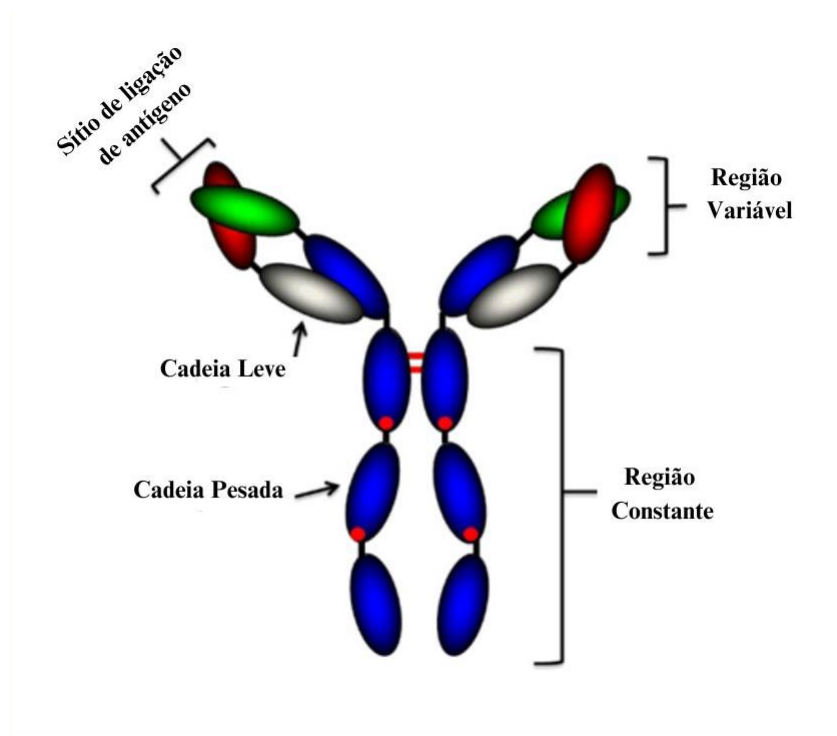
Há três fatores que são tidos como críticos para a performance adequada de um

biossensor. O primeiro fator está relacionado com a imobilização da biomolécula e a manutenção da atividade natural da mesma; o segundo fator diz respeito à acessibilidade dessa biomolécula ao analito de interesse, para que haja a ligação entre eles e, conseqüentemente, o reconhecimento. Por fim, também é necessário que ocorra uma baixa adsorção inespecífica da biomolécula ao suporte de reconhecimento, de modo a aumentar a disponibilidade das biomoléculas sobre a superfície (CHAUDHARY, et al., 2021; SHARMA et al, 2016).

Dessa forma, as propriedades físico-químicas da interface, das biomoléculas e também da superfície em que serão imobilizadas são de suma importância e devem ser consideradas na etapa de planejamento de um biossensor (CHAUDHARY, et al., 2021). Considerando o contexto da utilização de anticorpos, um dos maiores desafios na imobilização dos mesmos está na manutenção da atividade imunológica deles juntamente a sua especificidade. Por conta disso, existem métodos de mobilização que consideram tais fatores para aumentar a performance do imunossensor de acordo com sua aplicação (VASHIST; LUONG; 2018).

Nesse contexto, os anticorpos podem ser utilizados para essa finalidade, uma vez que suas características de especificidade e afinidade os tornam interessantes ferramentas de detecção. Constituintes do sistema imune, cuja imunidade pode ser inata ou adquirida, os anticorpos (Igs ou Abs) são classificados em cinco classes, IgM, IgG, IgE, IgA e IgD de acordo com sua especificidade. A constituição dos anticorpos está estruturada em duas regiões principais formadas por cadeias polipeptídicas pesadas e leves ligadas por ligações dissulfeto - a região constante, Fc e a região variável, Fab (Figura 2). Enquanto na Fc, há quatro cadeias polipeptídicas pesadas (Ch, do inglês heavy chain) e uma leve, na região Fab, há o fragmento variável Fv constituído pelas regiões determinadoras de complementariedade (CDRs) e os sítios de ligação de antígeno, que são específicas para cada antígeno (SHARMA, 2016).

Figura 3 - Estrutura geral dos anticorpos



Fonte: Adaptado de SHARMA (2016)

Como os anticorpos são glicoproteínas que possuem três principais grupos funcionais, como aminas primárias, grupamentos sulfídricos e carboidratos, estes possibilitam sua modificação como marcadores, *crosslinkers* ou imobilização sobre superfície de interesse. No caso da imobilização de anticorpos para a construção de biossensores, a utilização de reagentes que favoreçam sua permanência na superfície de trabalho é de suma importância para o desenvolvimento desse método de detecção. O grupo funcional mais comum para a imobilização de anticorpos é o grupo amina, do qual se tem presente um grupamento N-terminal em cada cadeia do polipeptídeo e ao lado da cadeia de resíduos de lisina (MELO, 2016; VASHIST; LUONG; 2018).

1.3 IMOBILIZAÇÃO DE ANTICORPOS

A imobilização de proteínas é fundamental para manter a atividade e estabilidade das mesmas para as mais diversas aplicações, incluindo processos industriais, visto que as proteínas não se mantêm estáveis em condições não controladas. (CHAUDHARY, et al., 2021). O uso de anticorpos imobilizados em superfícies favorece sua utilização em aplicações como imunodiagnósticos devido a sua alta reprodutibilidade juntamente à alta sensibilidade

de detecção que os anticorpos possuem. Contudo, a performance dos imunodiagnósticos é dependente do passo de imobilização, uma vez que as trocas de carga entre o suporte e o anticorpo podem ser ou não reversíveis. A existência de grupos funcionais reativos, associado à estabilidade mecânica do suporte, que confere rigidez ao mesmo, além de sua não-toxicidade, baixo custo e hidrofílico são características a serem consideradas para escolher o suporte mais adequado conforme a aplicação que se pretende (VASHIST; LUONG; 2018).

A ligação da porção Fc do anticorpo sobre a superfície do biossensor é tida como a ideal, visto que maximiza a disponibilidade da porção Fab para a ligação ao analito de interesse. Porém, sabe-se que os anticorpos podem se ligar em diferentes posições, o que reduz a atividade do anticorpo e pode até eliminá-la pela indisponibilidade da porção Fab. Além disso, também há chances de ocorrer estados intermediários na imobilização que reduzem o acesso da porção de ligação do antígeno, bem como a ligação de outros anticorpos em sítios de ligação próximas ao do antígeno, afetando a performance (SHARMA, et al. 2016). Por isso, existem alguns métodos de imobilização e também grupos funcionais específicos que reduzem essa possibilidade, já que essa região também possui grupos funcionais que podem se ligar à superfície.

As técnicas de imobilização de anticorpos em superfícies abrangem os métodos de imobilização não-covalentes, representada pela adsorção dos anticorpos na superfície. Esta pode ser direta ou com o uso de reagentes de imobilização para promover a funcionalização da superfície, baseada em *crosslinking*, ligações de van der Waals e interações hidrofóbicas, além de interações eletrostáticas. É um método simples e de baixo custo, pois ocorre em condições que não requerem o emprego de materiais tóxicos ou geram resíduos tóxicos, por não necessariamente implicar o uso de agentes de imobilização (VASHIST; LUONG; 2018).

Já os métodos de imobilização covalentes implicam uma modificação de ligação na superfície, sendo assim, esse tipo de imobilização favorece biossensores que demandam reuso ou longo tempo de prateleira, visto que estes necessitam que os anticorpos permaneçam estáveis na superfície (VASHIST; LUONG; 2018; SHARMA et al, 2016). No caso de utilização do rGO como material de suporte para esse tipo de imobilização, é necessário que se utilize dos chamados ‘agentes de imobilização’, que são reagentes que auxiliam na ligação entre anticorpo e suporte. O pireno-NHS é conhecido por interagir fortemente com o plano basal de grafite via empilhamento (π - *stacking*) (KATZ, 1994; JAEGFELDT et al, 1983), sendo que o processo de imobilização biomoléculas neste agente de bioconjugação acontece pela ligação com o grupo pirenil. Posteriormente ocorre uma

reação entre o Éster NHS e o intermediário formado entre o EDC e os grupos carboxílicos. Desta forma, o anticorpo poderá ser imobilizado por meio da ligação amida (KATZ, 1994; JAEGFELDT et al, 1983).

Por conta dos grupamentos amina presentes nos anticorpos, alguns grupos funcionais podem causar reações indesejadas, implicando na redução da atividade. As imobilizações baseadas em afinidade por grupamentos amina geralmente implicam em orientações aleatórias, por isso utiliza-se de grupamentos como biotina-avidina e proteína A, por exemplo, para auxiliar na orientação dos anticorpos e aumentar as possibilidades de ligações corretas. Essas moléculas possuem um grau de afinidade alto com os anticorpos e são amplamente utilizados para tal finalidade (SHARMA, et al. 2019).

No caso do presente trabalho, optou-se por utilizar apenas os agentes de bioconjugação pireno-NHS e EDC-NHS, visto que a proposta inicial é de avaliar uma imobilização que requeresse o menor número de reagentes e etapas possível, uma vez que o nível de complexidade de construção do imunossensor, reprodutibilidade e custo de produção são fatores que também influenciam no desenvolvimento do mesmo para distribuição em escala industrial.

1.4 ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS

A *Staphylococcus aureus* é uma bactéria gram-positiva, em formato de coco, anaeróbia facultativa, catalase e coagulase positiva, cujas colônias são caracterizadas pela coloração amarela. Secrete diversos fatores de virulência como enzimas, exotoxinas, citotoxinas e toxinas esfoliativas, que são utilizados para transformar os componentes das células hospedeiras em substrato para o crescimento bacteriano. Dentre as exotoxinas secretadas, destacam-se as enterotoxinas estafilocócicas (SEs, do inglês *Staphylococcus aureus Enterotoxins*), que são majoritariamente responsáveis pelas intoxicações alimentares decorrentes da presença de *S. aureus* em alimentos (WHO, 2008; PINCHUK; BESWICK; REYES, 2010). Devido a combinação entre fatores tóxicos de virulência, invasividade e resistência a antibióticos, a bactéria *S. aureus* é um patógeno significativo no que tange infecções e intoxicações (LE LOIR, 2003).

As SEs são proteínas de cadeia curta secretadas no substrato de crescimento bacteriano durante a fase logarítmica ou na transição da fase exponencial para a fase estacionária. Ricas em lisina, ácido glutâmico, ácido aspártico e resíduos de tirosina, são também solúveis em água e em soluções salinas, ativas mesmo em pequenas quantidades e resistentes à inativação

por meio das proteases gastrointestinais, o que possibilita a passagem delas pela barreira do epitélio intestinal (BALABAN.; RASOOLY, 2000). Outra característica de suma importância das SEs em termos de segurança alimentar é a termoestabilidade das mesmas, ou seja, a resistência dessas enterotoxinas a altas temperaturas, que pode estar relacionada a fatores como pH do meio em que se encontram, concentração de sais e nível de desnaturação proteica que elas podem atingir (WHO, 2008; FAGUNDES, 2010).

Dentre os mais de 20 tipos diferentes de SEs, que inclui enterotoxinas associadas à síndrome do choque tóxico (SEF), intoxicações alimentares (SEA, SED, SEE, SEG, SEH e SEI) e até mesmo estudos envolvendo armas biológicas (SEB), as enterotoxinas A e B (respectivamente designadas como SEA e SEB) são as mais frequentes (PINCHUK; BESWICK; REYES, 2010). A SEA será o foco da presente proposta, uma vez que é a enterotoxina mais associada às intoxicações alimentares.

O modo de ação das SEs no organismo baseia-se em interações imunológicas, uma vez que são classificadas como superantígenos, pois possuem a capacidade de estimularem ampla população de células T. O evento primário da resposta celular imune é o reconhecimento do antígeno pelo receptor desse antígeno na membrana da célula T (TCR). Os receptores de SEs nas células antígeno presentes (APCs, do inglês *antigen presenting cells*) são moléculas MHC classe II, requeridas para ligarem-se na região viável da cadeia beta do antígeno da célula T (BALABAN.; RASOOLY, 2000). Os superantígenos podem interagir com várias células T simultaneamente de maneira não específica e, no caso da interação entre MHC II:SEs:TCR, ocorre hiperativação das APCs e células T do organismo, levando à proliferação excessiva das células T e secreção incontrolada de diversas citocinas e quimiocinas pró- inflamatórias, tendo como consequência inflamação aguda mediada pelo superantígeno e choque (BALABAN.; RASOOLY, 2000; OLIVEIRA, 2011).

A contaminação alimentar causada por *Staphylococcus aureus* merece destaque devido aos tipos de alimentos que contamina e aos fatores que causam os sintomas, uma vez que essa bactéria secreta toxinas nos alimentos em que está presente, caracterizando uma intoxicação alimentar cujos sintomas são muito semelhantes aos de outras infecções ou intoxicações causadas por outros agentes patogênicos (WHO, 2008). A ingestão de alimentos já preparados, tais como carnes e seus derivados, leite e derivados, ovos, tortas, bolos, massas recheadas com cremes, enlatados e embutidos no geral, que podem ser facilmente contaminados durante as etapas de preparo e processamento, constituem o principal veículo de entrada da *S. aureus* no organismo (WHO, 2008; FAGUNDES, 2010). A presença de *S. aureus* em alimentos crus não implica em intoxicação, uma vez que existem outras espécies

bacterianas presentes para competir com o substrato, o que acarreta na inibição de crescimento dessa bactéria, favorecendo a multiplicação da mesma em alimentos cozidos cuja temperatura de armazenamento ou preparo seja inferior a 40 °C e superior a 7 °C (WHO, 2008).

O armazenamento inadequado de alimentos já preparados decorrente de falhas durante o processo de refrigeração ou preparo de alimentos em temperaturas permissivas de crescimento bacteriano, bem como aquisição de matérias-primas que podem estar contaminadas, como leite advindo de animais com mastite e, principalmente, o processamento de alimentos que necessitam de manuseio com as mãos também são vias de contaminação, pois a temperatura de crescimento de *S. aureus* está entre 7 a 48 °C, abrangendo temperaturas ambientes da maioria dos países; o agente etiológico mais recorrente da infecção das mamas de bovinos é a *S. aureus* e cerca de 25-40% da população humana saudável naturalmente convive com a presença dessa bactéria na pele, nariz e garganta, aumentando a possibilidade de contaminação manual (WHO, 2008; FLORES; MELO, 2015).

1.5 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS

As técnicas atuais para detecção das enterotoxinas supracitadas baseiam-se em diferentes princípios e métodos que buscam aperfeiçoar a sensibilidade e seletividade da detecção. Incluem testes em animais e testes sorológicos, que são considerados métodos convencionais (denominados biológicos); técnicas de biologia molecular como reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR) e hibridação de ácidos nucleicos; cromatografia e imunoenaios. Estes destacam-se por apresentarem alta especificidade e sensibilidade, rapidez de operação e possibilidade de detectar as SEs em amostras complexas sem a necessidade de tratamentos extensivos das amostras para análise devido ao fato de basearem-se na ligação anticorpo-antígeno. Dentre eles, encontram-se os imunoenaios ópticos, colorimétricos, fluorescentes, quimioluminescentes, ressonância de plásmons de superfície (*surface plasmon resonance*, SPR), eletroquimioluminescentes e eletroquímicos (FATIBELLO FILHO; CAPELATO, 1992; MELO, 2016).

Atualmente, as principais técnicas empregadas para detecção de SEs abrangem o imunoensaio enzimático ELISA (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*), *Optimum Sensitivity Plate* (OSP) e PCR, adaptadas para atender necessidades envolvendo tempo gasto para análise e especificidade e sensibilidade para detecção. Mesmo assim, esses métodos requerem pelo menos 24 h a 72 h (este no caso do OSP) para cada análise e pré-tratamentos

amostrais com o intuito de reduzir interferências ocasionadas por agentes contidos nas próprias amostras, e ainda, no caso da PCR, a detecção dos genes codificantes das enterotoxinas não implica na presença das mesmas na amostra (MELO, 2016; WU, 2016).

No contexto de trabalhos científicos envolvendo especificamente a detecção de SEA pautada em imunodiagnósticos eletroquímicos, PIMENTA-MARTINS (2012) e seus co-autores desenvolveram um imunossensor do tipo sanduíche (*self-assembly monolayer*, SAM), imobilizando os anticorpos anti-SEA em eletrodos de ouro modificados com cisteamina e utilizando a proteína A para favorecer a ligação específica entre os anticorpos e os antígenos. A imobilização dos anticorpos por meio da adsorção física, *cross-linking* com glutaraldeído e imobilização covalente com o agente de bioconjugação EDC/NHS no eletrodo de ouro modificado com a cisteamina foi avaliada e ao compará-los, os autores obtiveram como resultado satisfatório o método que utilizou o EDC/NHS. Outro trabalho nesse mesmo contexto abrange o uso utilizando também eletrodos de ouro modificados com cisteamina e proteína A para construir o imunossensor do tipo SAM, baseado em cristais de quartzo microbalanceados com dissipação como método de transdução (SALMAIN, 2011).

Os trabalhos mais recentes envolvendo rGO como material de suporte na detecção de SEA são referentes ao uso de aptâmeros como biomoléculas a serem imobilizadas (JIA, et al. 2014; NODOUSHAN, et al. 2022). Isso demonstra que há um interesse científico em melhorar os atuais métodos de detecção dessa toxina utilizando-se da biotecnologia. É de suma importância que pesquisas sejam realizadas nessa área para assegurar a qualidade dos alimentos comercializados aos consumidores, nas suas diversas categorias. A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) possui normas de padrões microbiológicos para alimentos, que incluem a presença de enterotoxinas estafilocócicas, principalmente em queijos e seus derivados, produtos em pó lácteos e suplementos derivados de proteínas (ANVISA, 2019). Desse modo, o presente trabalho contribui para o desenvolvimento de novas estratégias de métodos de detecção ao avaliar a imobilização de anticorpos anti-SEA em rGO para detectar SEA em alimentos.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal dessa pesquisa foi avaliar a imobilização de anticorpos anti-SEA em óxido de grafeno reduzido (rGO), analisando sua performance frente a diferentes métodos para imobilizar anticorpos anti-SEA.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a imobilização por adsorção física do anticorpo anti- SEA na superfície de eletrodos de carbono vítreo modificados com rGO;
- Avaliar a imobilização com dois agentes de bioconjugação do anticorpo anti-SEA na superfície de eletrodos de carbono vítreo modificados com rGO;
- Determinar qual método de imobilização é mais vantajoso para ser empregado na construção desse imunossensor;
- Analisar a performance do imunossensor na detecção de diferentes concentrações de SEA em amostras de leite.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Nesse item será abordada a metodologia empregada, bem como a instrumentação e os reagentes e soluções utilizados para a execução dessa pesquisa, levando em consideração o atendimento a normas de biossegurança e ambientais para uso responsável e descarte adequado dos resíduos.

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados nesse trabalho foram de grau analítico (PA) e sem purificação prévia, utilizando água purificada em sistema Millipore Milli-Q (resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$). Para as caracterizações eletroquímicas foi utilizada a solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Já para as etapas de limpeza dos eletrodos foi utilizada solução tampão fosfato (PBS) $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4.

O anticorpo anti-SEA (100 mg/mL), a SEA (30 mg/mL), o GO (4 mg/mL), a soroalbumina bovina (BSA), HAuCl_4 , EDC-NHS e pireno-NHS foram adquiridos da Sigma Aldrich (EUA).

3.2 INSTRUMENTAÇÃO

Para a realização dos experimentos foi utilizada uma célula eletroquímica de vidro convencional de três eletrodos: eletrodo de trabalho de carbono vítreo (Glassy Carbon, GC), onde foram realizadas as modificações necessárias para as análises; eletrodo de referência Ag/AgCl/KCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e uma placa de platina como eletrodo auxiliar. Para a realização dos experimentos de voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foi utilizado o potenciostato PGSTAT-128N Autolab (Eco Chemie, 9 Utrecht, Holanda) equipado com software NOVA 2.0 (Eco Chemie, Utrecht, Holanda). E para os experimentos de espectroscopia UV-VIS, foi utilizado o espectrofotômetro UV-M51 (Bel Photonics, Itália).

A morfologia dos nanomateriais foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura acoplada a um canhão de elétrons (FEG-SEM), marca Quanta 200 (FEI Company, Hillsboro, USA), e também por espectroscopia Raman no Laboratório de Microscopia Avançada (LMA) do Instituto de Química - Unesp Araraquara.

3.3 SÍNTESE DO ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO (RGO)

A redução química do GO foi realizada utilizando dodecilsulfato de sódio (SDS) como surfactante e borohidreto de sódio (NaBH_4) como agente redutor. Primeiramente, foram adicionados em um béquer 5,0 mL de uma dispersão 4 mg/mL de óxido de grafeno (GO) em água, juntamente com 8,0 mg de SDS em 15 mL de etanol (grau analítico); em seguida, essa solução permaneceu durante 20 min em banho ultrassônico (Embrasol TEC). O surfactante SDS foi utilizado com a finalidade de diminuição da tensão superficial da suspensão que foi formada, já que este é um composto que apresenta capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido.

Em seguida, foram adicionados 16,0 mg de NaBH_4 , pois atua como um redutor do óxido de grafeno, e essa suspensão foi sonicada por aproximadamente 20 minutos, até que se completasse a solubilização do sal. Após a síntese, o rGO foi centrifugado por 5 minutos com rotação de 6200 rpm e lavado várias vezes com etanol até a solução tornar-se incolor. No final, descartou-se o sobrenadante, e ao sólido adicionou-se 5 mL de etanol, então, o composto rGO foi seco à uma temperatura de 60 °C. Depois de seco, preparou-se uma suspensão de 0,025 mg de rGO e 1,0 mL de água ultrapura, que foi armazenada à 4 °C.

3.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO GO E RGO

A morfologia das superfícies dos eletrodos modificados com GO e rGO foi caracterizada por FEG-SEM. A microscopia do GO permite avaliar as diferenças entre o GO e rGO.

3.5 ESPECTROSCOPIA RAMAN

O GO e o rGO foram caracterizados por espectroscopia Raman, que é uma técnica que utiliza uma fonte monocromática de luz a qual, ao atingir uma amostra, é espalhada gerando luz de energia igual (elástica) ou diferente (inelástica) da energia incidente. Com o espalhamento inelástico consegue-se obter muitas informações importantes sobre a composição química da amostra a partir da diferença de energia (LOBO, 2005).

3.6 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO GO E RGO

A caracterização eletroquímica é uma etapa de suma importância para avaliar se as modificações realizadas na superfície dos eletrodos foi bem sucedida. No caso da

caracterização eletroquímica do GO e do rGO, também é possível distingui-los pelos perfis voltamétricos que apresentam.

Para analisar a imobilização dos anticorpos anti-SEA no eletrodo modificado com rGO, na presença e ausência dos agentes de imobilização, foram obtidos perfis voltamétricos por CV no intervalo de -0,3 V a +0,9 V vs. Ag/AgCl em solução 0,1 mol L⁻¹ KCl contendo 5,0 mmol L⁻¹ do par redox [Fe(CN)₆]^{3-/4-} com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. Além disso, foi realizada a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), com frequência variante do espectro de 10⁷ a 10⁻² Hz e 10 mV de amplitude. O espectro da impedância foi gravado em circuito aberto (OCP) em solução KCl 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) contendo 5,0 mmol L⁻¹ de [Fe(CN)₆]^{3-/4-}, sendo que o ajuste e o cálculo para circuitos elétricos equivalentes, R_s, CPE e valores de α e R_{ct} foram realizados utilizando ferramentas de ajuste de circuito eletroquímico no software Nova 2.0.

A ferramenta *electrochemical circle fit* do software NOVA 2.0 permite a análise de dados de medidas de impedância, de modo a obter a estimativa dos valores dos parâmetros de interesse por meio do ajuste de determinados pontos de uma porção circular do diagrama de Nyquist a um circuito equivalente. Esse circuito é composto pelos elementos R_s (Ohm), R_{ct} (Ohm) e CPE. O primeiro simula o valor da resistência não compensada (da solução); o segundo elemento simula o valor da resistência de polarização, referente à resistência de transferência de carga; já o terceiro, é o valor do argumento do elemento de fase constante (ROCHA, 2014).

3.7 LIMPEZA DOS ELETRODOS DE CARBONO VÍTREO

O polimento e a limpeza do eletrodo GC é essencial para assegurar que reduza a ocorrência de interferências no sinal analítico a ser gerado pela presença de substâncias interferentes que possivelmente estejam presentes na superfície do eletrodo, ocasionando na interferência no sinal analítico a ser gerado. O polimento do eletrodo foi feito em suspensão de alumina 0,5 µm em lixadeira politriz modelo PLFDV (Fortel) a 350 rpm de modo que a superfície do eletrodo estivesse visualmente espelhada, seguido de banho de ultrassom (Embrasol TEC) em etanol durante cinco minutos e, em água ultrapura por mais cinco minutos e seco em estufa à 60 °C.

3.8 PREPARAÇÃO DOS ELETRODOS DE TRABALHO

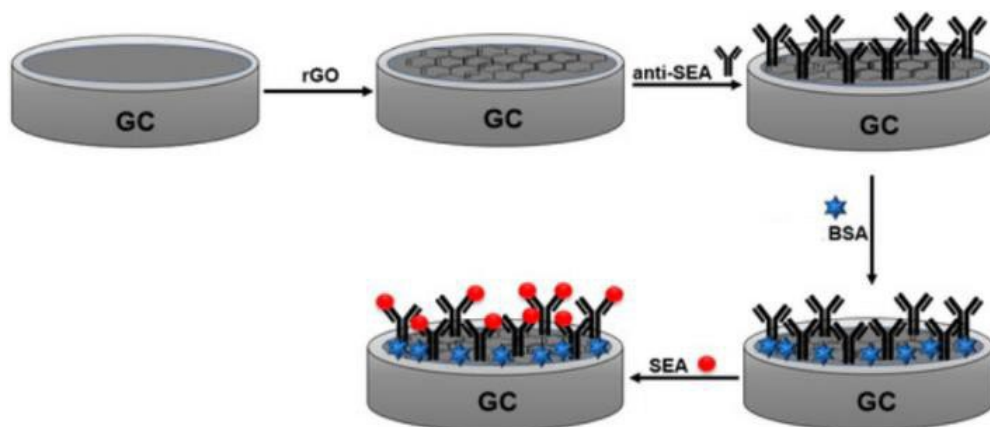
Nesta seção, estão descritas detalhadamente as etapas realizadas para a avaliação das

imobilizações. A metodologia de construção do imunossensor foi adaptada de PIMENTA-MARTINS (2012), utilizando a diluição de 1:1000 para os anticorpos anti-SEA e para SEA, em tampão fosfato pH 7,4, juntamente ao protocolo de modificação de eletrodos com rGO aplicado pelo Laboratório de Eletroanalítica e Nanotecnologia da UNESP Botucatu, local onde os experimentos foram realizados. Análises de voltametria cíclica (CV) e de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) foram realizadas antes de cada etapa de adição das substâncias no eletrodo, assim como foram efetuadas lavagens dos eletrodos em PBS pH 7,4 por imersão durante 30 segundos após cada período de incubação com o intuito de eliminar substâncias não ligadas à superfície.

3.8.1 Eletrodo GC modificado com rGO

Na superfície de dois eletrodos GC limpos e polidos, foram gotejados 10 μL da suspensão de rGO, sendo secos em estufa à 40 °C. 10 μL do anticorpo anti-SEA foram gotejados na superfície dos eletrodos e incubado por 1 hora em temperatura ambiente (25 °C). 20 μL de solução bloqueadora BSA 1% foi adicionada e incubada por 30 min (à 25 °C). Após o tempo de incubação e respectivas medições de CV e EIS, 10 μL de SEA diluído 1:1000 foram adicionados e incubados por 1 hora em temperatura ambiente. A Figura 4 ilustra o procedimento realizado nessa modificação.

Figura 4 - Modificação do eletrodo GC com rGO

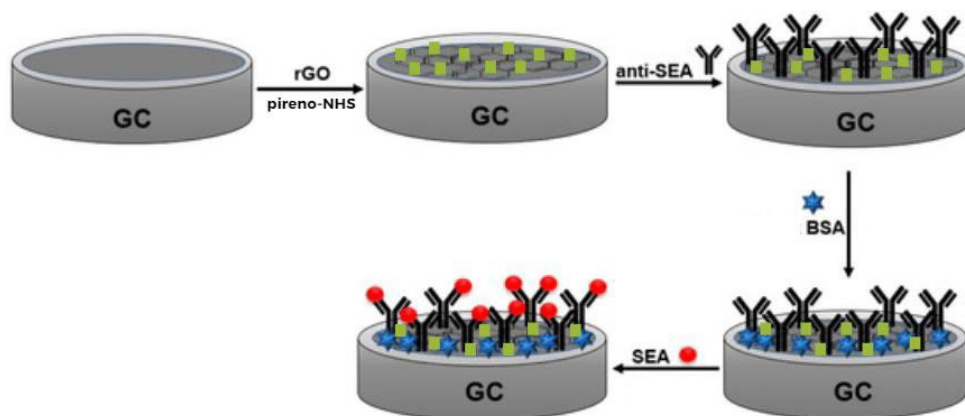


Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

3.8.2 Eletrodo GC modificado com rGO/pireno-NHS

Na superfície de dois eletrodos GC limpos e polidos, foram gotejados 10 μL da suspensão de rGO, sendo secos em estufa à 40 $^{\circ}\text{C}$. Após este processo, foram gotejados 10 μL de uma suspensão de pireno-NHS na concentração $5,0 \cdot 10^{-4}$ M, seco em temperatura ambiente (25 $^{\circ}\text{C}$). 10 μL do anticorpo anti-SEA foram gotejados na superfície dos eletrodos GC/rGO/pireno-NHS, sendo incubados por 1 hora em temperatura ambiente (25 $^{\circ}\text{C}$). 20 μL de solução bloqueadora BSA 1% foi adicionada e incubada por 30 min em temperatura ambiente (25 $^{\circ}\text{C}$). Após o tempo de incubação e respectivas medições de CV e EIS, 10 μL de SEA diluído de 1:1000 foram adicionados e incubados por 1 hora em temperatura ambiente. A Figura 5 ilustra o procedimento realizado nessa modificação.

Figura 5 - Modificação do eletrodo GC com rGO/pireno-NHS

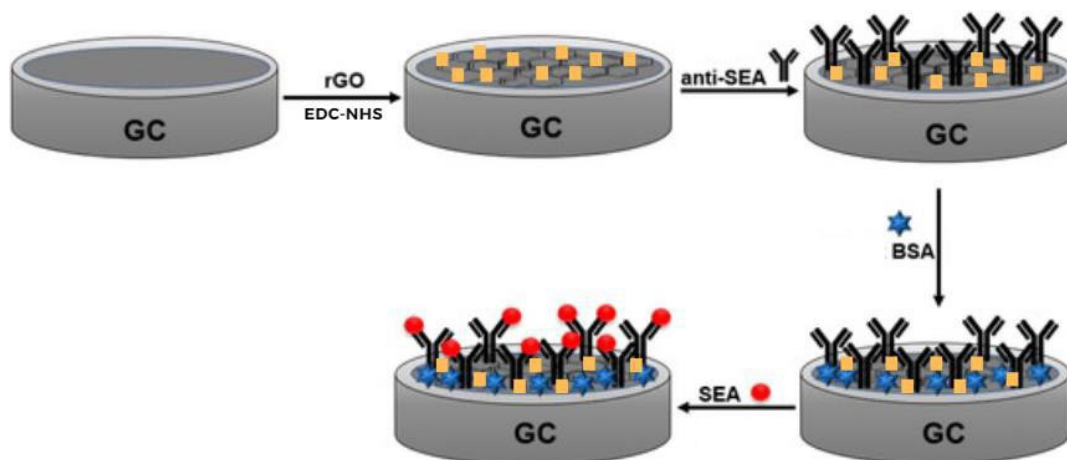


Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

3.8.3 Eletrodo GC modificado com rGO/EDC-NHS

Na superfície de dois eletrodos GC limpos e polidos, foram gotejados 10 μL de uma suspensão de rGO, sendo secos em estufa à 40 °C. Após este processo, foram gotejados 10 μL de uma suspensão de EDC/NHS (na concentração 5,0. 10^{-3} mol L^{-1} e 8,0. 10^{-3} mol L^{-1} , respectivamente, seco em temperatura ambiente (25 °C). Em seguida, 10 μL do anticorpo anti- SEA foram gotejados na superfície dos eletrodos, sendo incubados por 1 hora em temperatura ambiente (25 °C). 20 μL de solução bloqueadora BSA 1% foi adicionada e incubada por 30 min em temperatura ambiente (25 °C). Após o tempo de incubação e respectivas medições de CV e EIS, 10 μL de SEA diluído de 1:1000 foram adicionados e incubados por 1 hora em temperatura ambiente. A Figura 6 ilustra o procedimento realizado nessa modificação

Figura 6 - Modificação do eletrodo GC com rGO/EDC-NHS



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

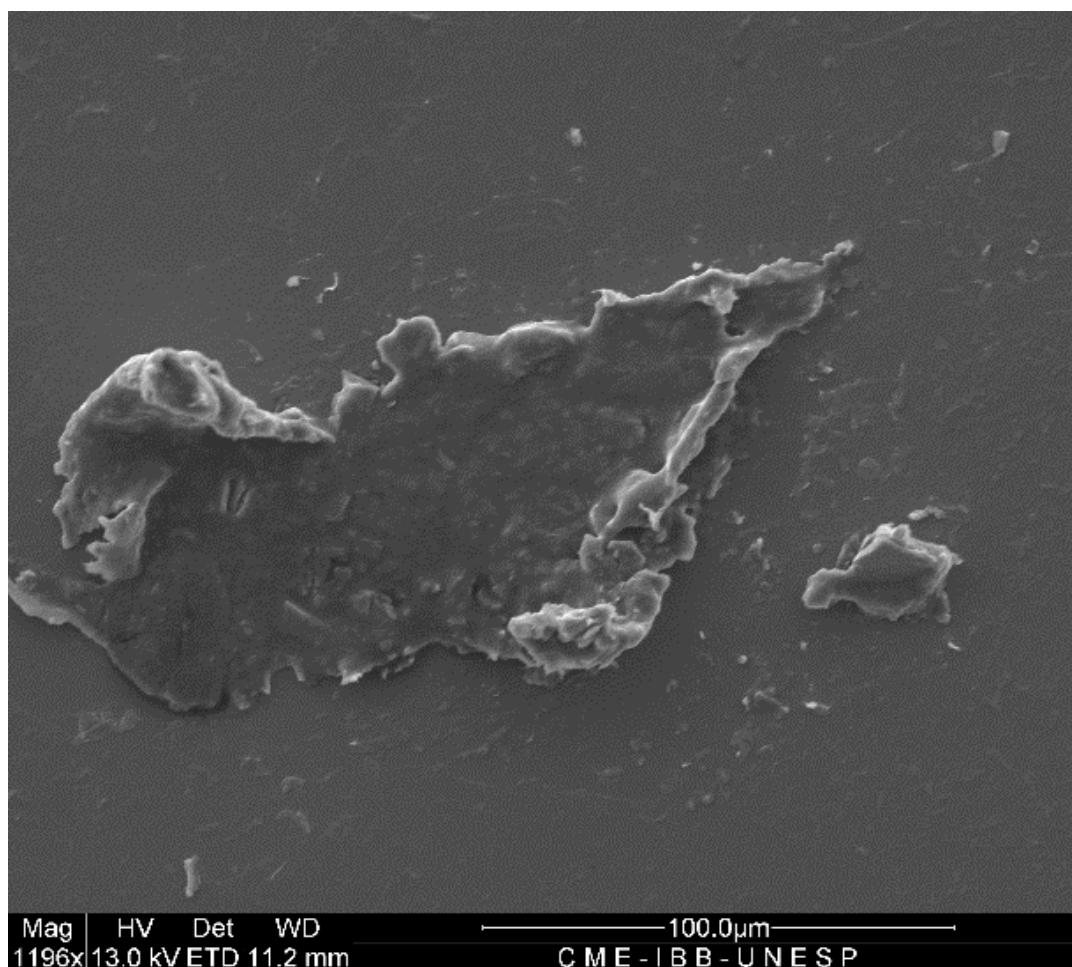
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste tópico estão apresentados os principais resultados obtidos durante a execução da pesquisa, bem como as análises pertinentes para cada etapa e suas respectivas discussões, de modo a promover a reflexão sobre aspectos ali presentes.

4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO GO E RGO

A micrografia do GO apresentada na Figura 7 evidencia a configuração em camadas e multicamadas que o GO tipicamente. O óxido de grafeno, assim como os demais materiais bidimensionais, tende-se a empilhar devido as interações π - π , provocando o bloqueio dos sítios cataliticamente ativos.

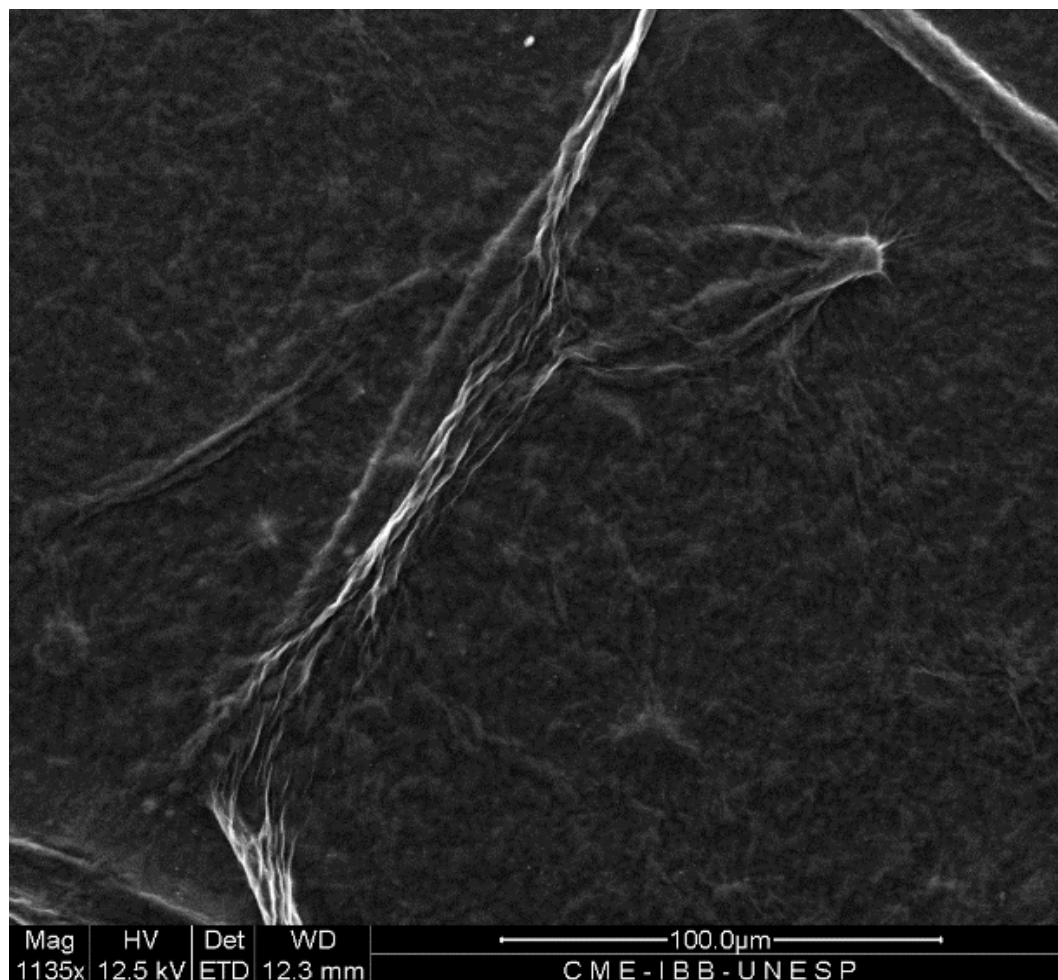
Figura 7 - Micrografia FEG-SEM do GO



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Na Figura 8, a micrografia apresenta imagens da configuração do rGO, em que o material de grafite exibe uma estrutura tipicamente torcida, enrugada e com muitas ondulações, aumentando assim a área superficial do eletrodo quando aplicado nos biossensores.

Figura 8 - Micrografia FEG-SEM do Óxido de Grafeno Reduzido



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

4.2 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO GO E RGO

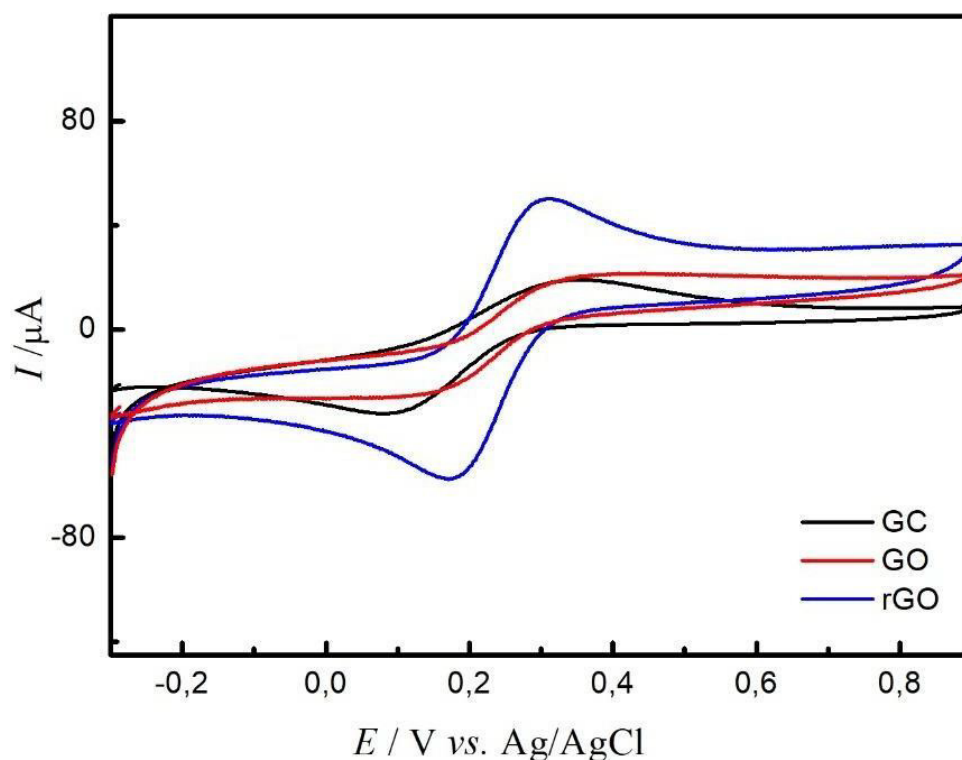
A caracterização eletroquímica é uma etapa de suma importância para avaliar se as modificações realizadas na superfície dos eletrodos foram bem sucedidas. No caso da caracterização eletroquímica do GO e do rGO, também é possível distingui-los pelos perfis voltamétricos que apresentam.

4.2.1 Voltametria cíclica

Experimentos de voltametria cíclica foram realizados em solução de hexacianoferrato (III) de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$) $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} no intervalo de $-0,1 \text{ V}$ a $+0,9 \text{ V}$ vs. $Ag/AgCl/KCl$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) para a caracterização eletroquímica do GO e rGO. A Figura 9 apresenta os perfis voltamétricos para três diferentes

eletrodos - eletrodo de carbono vítreo; eletrodo de carbono vítreo modificado com GO e eletrodo de carbono vítreo modificado com rGO.

Figura 9 - Voltamogramas Cíclicos dos eletrodos GC, GC/GO e GC/rGO



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Os perfis voltamétricos obtidos apresentaram picos de oxidação e redução bem definidos para os eletrodos estudados devido a presença do par redox $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$. Essa configuração das curvas demonstra que o eletrodo GC/rGO apresentou uma melhora na reversibilidade dos processos de oxidação e redução, uma vez que o aumento na corrente de pico para o rGO, quando comparado com o GO. Essa diferença decorre da presença de defeitos estruturais introduzidos no óxido de grafeno reduzido, promovendo o aumento da razão C/O. Desse modo, há indícios de que as sínteses dos materiais em laboratório foram realizadas com sucesso e estavam adequados para serem empregados na pesquisa.

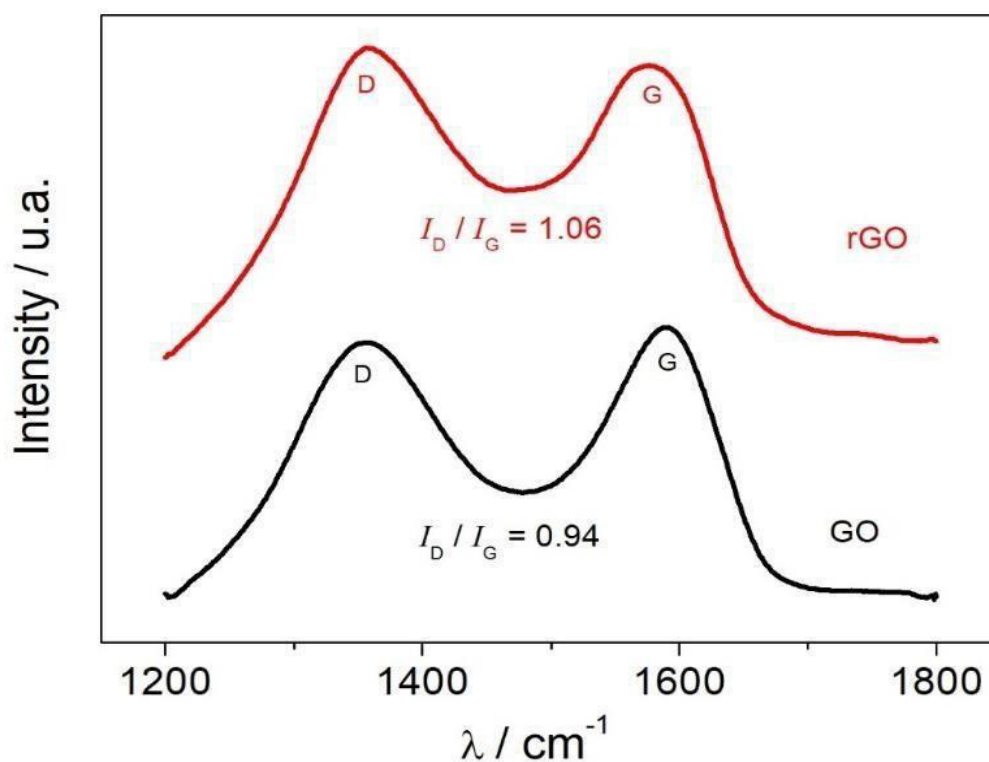
4.3 ESPECTROSCOPIA RAMAN

Na Figura 10 encontra-se o espectro de Raman típico para as folhas de GO e rGO. Observou-se que o GO sintetizado apresentou duas bandas de absorção características no seu espectro Raman: a banda G em 1590 cm^{-1} e a banda D em 1355 cm^{-1} . A banda G corresponde a ligação que se estende entre os pares de carbono sp^2 e, a banda D está associada

com a vibração dos anéis aromáticos com oscilações das ligações terminais no plano.

A relação entre a intensidade da banda D (I_D) e da banda G (I_G) é normalmente utilizada para avaliar a dimensão dos domínios no plano sp^2 para materiais de carbono. O valor obtido para a relação I_D/I_G foi de 0,94 para as folhas de GO sintetizadas. Observou-se que o rGO também apresentou as duas bandas de absorção característica no espectro Raman, porém a banda D apresenta uma maior amplitude. A maior amplitude da banda D é devido à presença de defeitos introduzidos por grupos funcionais, tais como, grupos carboxilas, hidroxilas e epóxi (CINCOTTO, 2014; FERRARI, 2006). A relação I_D/I_G foi de 1,06 para as folhas de rGO, comprovando que as folhas de óxido de grafeno foram reduzidas, assim como observada na micrografia FEG-SEM da Figura 8.

Figura 10 - Espectros de Raman para rGO e GO

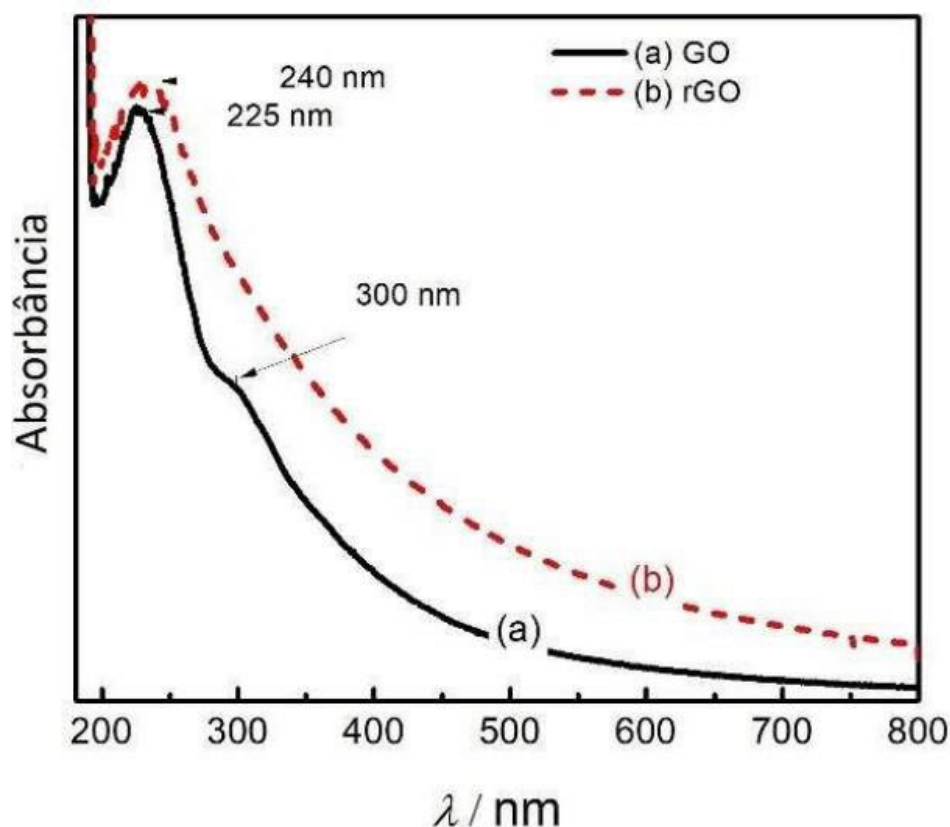


Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

4.4 CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS

A caracterização dos materiais por espectroscopia UV-vis está representada na Figura 11. Como observado em outros trabalhos (ROKMANA, 2018; EMIRU; AYELE, 2017; GURUNATHAN, 2012), o espectro UV-vis do GO mostrou duas bandas máximas em 225 e 300 nm para o GO, que são devidas à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ de ligações C-C aromáticas e transição $n \rightarrow \pi^*$. No entanto, o rGO apresentou apenas uma banda máxima a 240 nm; estes resultados foram esperados, uma vez que o rGO tem um coeficiente de C/O mais alto devido à remoção de funcionalidades de oxigênio e ao estabelecimento de estruturas de grafeno conjugadas com $C = C$, conforme observado por espectroscopia Raman.

Figura 11 -Espectros UV-Vis GO e rGO



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

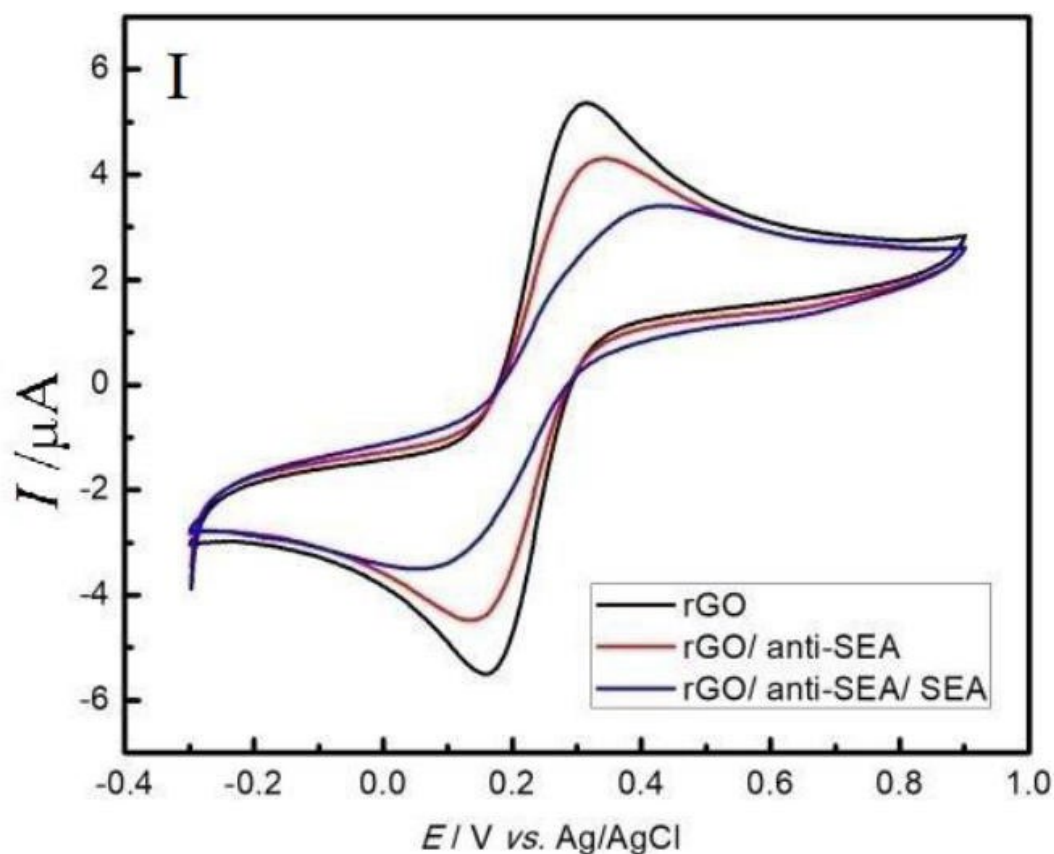
4.5 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS ELETRODOS MODIFICADOS

Neste item está apresentada a caracterização eletroquímica por voltametria cíclica (CV) e por impedância de espectroscopia eletroquímica (EIS) para cada um dos eletrodos modificados.

4.5.1 Eletrodo GC modificado com rGO

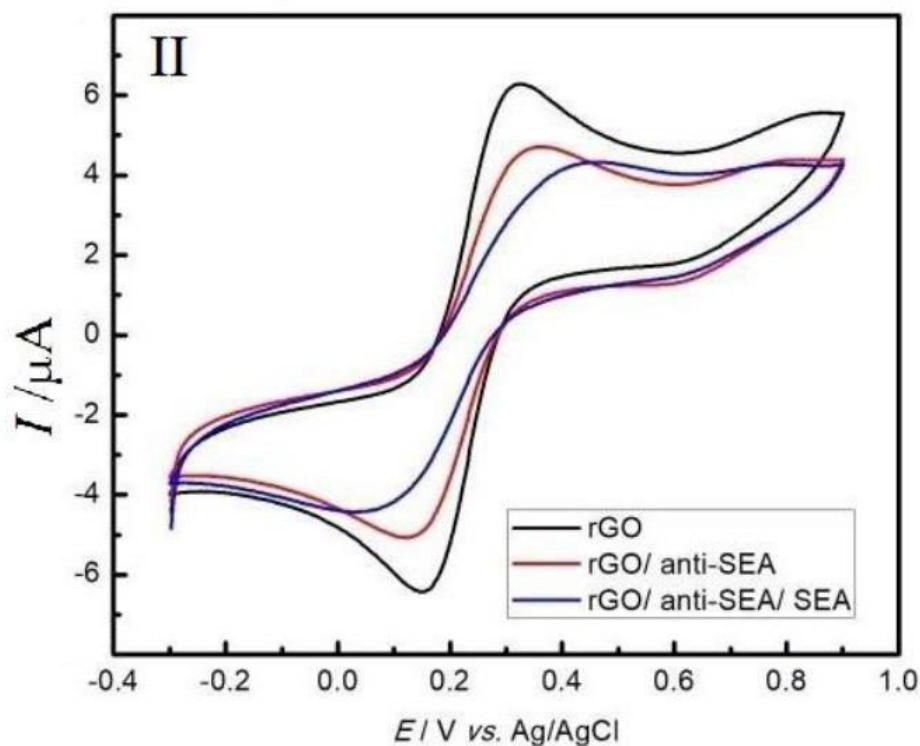
As Figuras 12 e 13 mostram os voltamogramas obtidos para os eletrodos GC modificados com rGO, anti-SEA e SEA, por meio de voltametria cíclica em solução 0,1 mol L⁻¹ KCl contendo 5,0 mmol L⁻¹ do par redox [Fe(CN)₆]^{3-/4-}. Os potenciais de oxidação e redução dos eletrodos modificados estão contidos na Tabela 1.

Figura 12 - Caracterização CV do eletrodo (I) modificado com rGO



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Figura 13 - Caracterização CV do eletrodo (II) modificado com rGO



Fonte: Autoria própria (2023)

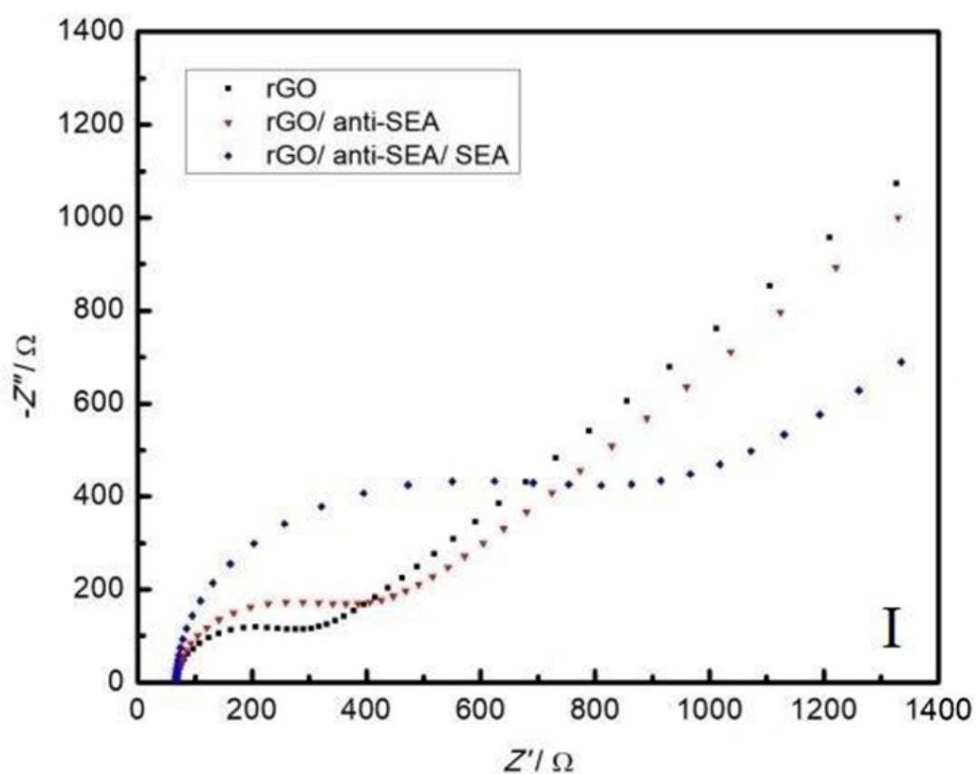
Tabela 1- Potenciais de redução e oxidação dos eletrodos modificados com rGO, anti-SEA e SEA

Eletrodos	Oxidação (V)		Redução (V)	
	I	II	I	II
rGO	+0,31	+0,32	+0,15	+0,14
rGO/ anti-SEA	+0,33	+0,36	+0,13	+0,12
rGO/anti-SEA/SEA	+0,42	+0,45	+0,05	+0,04

Fonte: Autoria própria (2023)

Nas Figuras 14 e 15 estão representados os Diagramas de Nyquist para a modificação dos eletrodos com rGO e na Tabela 2, os respectivos potenciais de oxidação e redução.

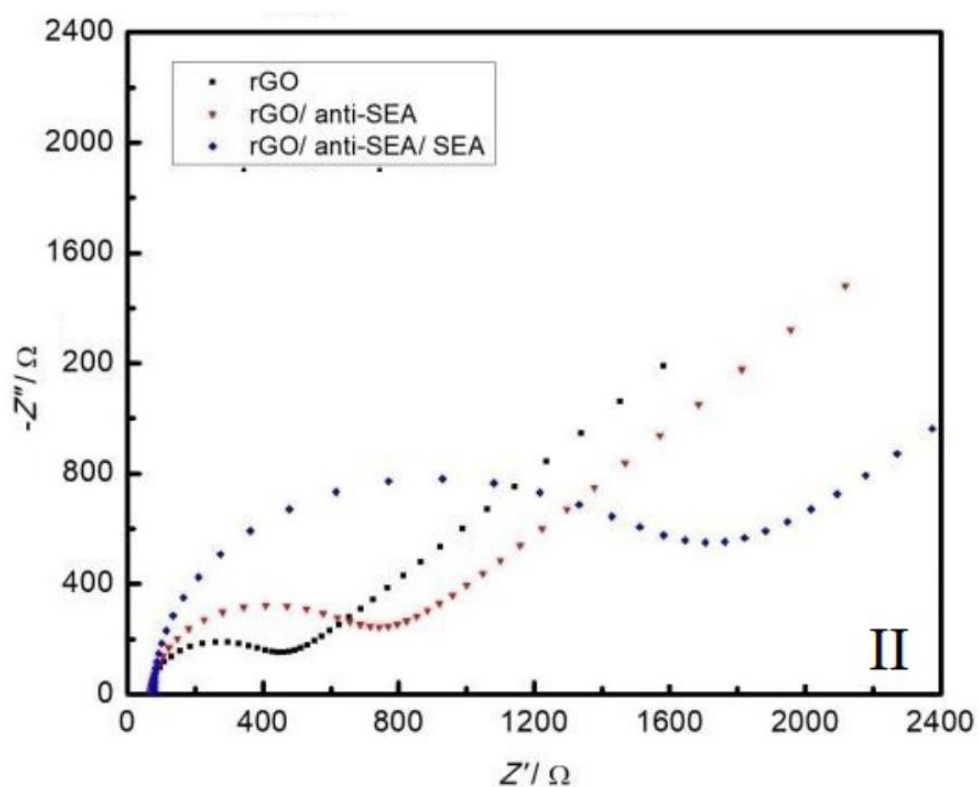
Figura 14- Diagrama de Nyquist do eletrodo I modificado com rGO



Legenda: eletrodo modificado com rGO (■), presença do anticorpo (▼) e presença do antígeno (◆). No detalhe: intervalo de alta frequência e circuito elétrico equivalente em PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 7,4, e em solução 0,1 mol L⁻¹ KCl contendo 5,0 mmol L⁻¹ do par redox [Fe (CN)₆]^{3- / 4-}.

Fonte: Autoria própria (2023)

Figura 15- Diagrama de Nyquist do eletrodo II modificado com rGO



Legenda: eletrodo modificado com rGO (■), presença do anticorpo (▼) e presença do antígeno (◆). No detalhe: intervalo de alta frequência e circuito elétrico equivalente em PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 7,4, e em solução 0,1 mol L⁻¹ KCl contendo 5,0 mmol L⁻¹ do par redox [Fe (CN)₆]^{3- / 4-}.

Fonte: Autoria própria (2023)

Tabela 2- R_{ct} e R_s dos eletrodos modificados com rGO, anti-SEA e SEA

Eletrodos	R_{ct} ($k\Omega$)		$R_s(k\Omega)$	
	I	II	I	II
rGO	267,43	408,23	65,70	63,96
rGO/ anti-SEA	368,86	702,51	66,99	66,97
rGO/anti-SEA/SEA	932,28	1685,4	62,02	66,65

Fonte: Autoria própria (2021)

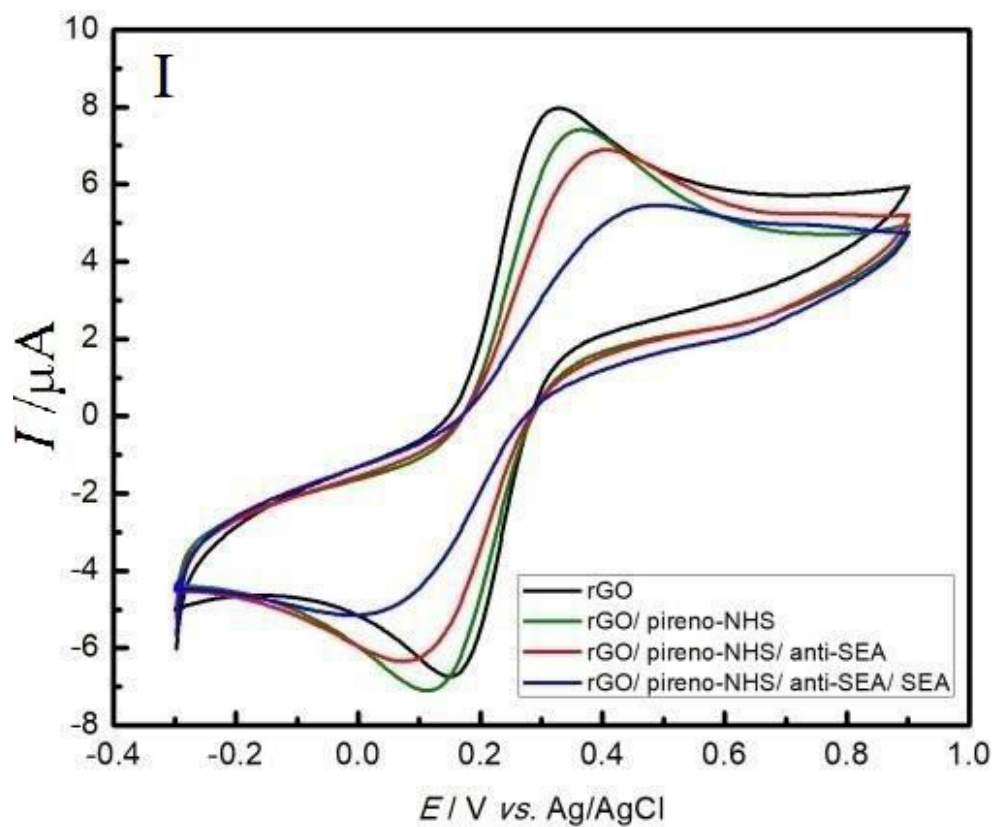
Observando os dados obtidos da medição de CV e de EIS para os eletrodos modificados apenas com rGO, nota-se que houve um aumento da resistência de transferência de carga e diminuição das correntes de pico anódico e catódico à medida que o anticorpo e o antígeno eram adicionados na superfície dos eletrodos. Essa mudança é decorrente do controle difusional que passa a ocorrer da espécie eletroativa em solução, representada pelo par redox Fe^{3+}/Fe^{2+} . Considerando também as características estruturais do rGO juntamente com as cargas disponíveis para a ligação do anticorpo na superfície, conclui-se que houve a adsorção do anticorpo ao rGO.

Além disso, também pode-se inferir que a etapa de bloqueio com o BSA dos sítios de ligação no rGO em que os anticorpos não se ligaram foi efetiva. Quando há ligações inespecíficas do antígeno, seja no anticorpo ou na superfície, os perfis voltamétricos e de EIS tendem a apresentar valores superiores se comparado aos valores padrão que apontam a existência de uma barreira para a passagem dos elétrons em solução sobre a superfície. No caso desse método de imobilização, os valores obtidos demonstram que a imobilização foi bem sucedida.

4.5.2 Eletrodo GC modificado com rGO/pireno-NHS

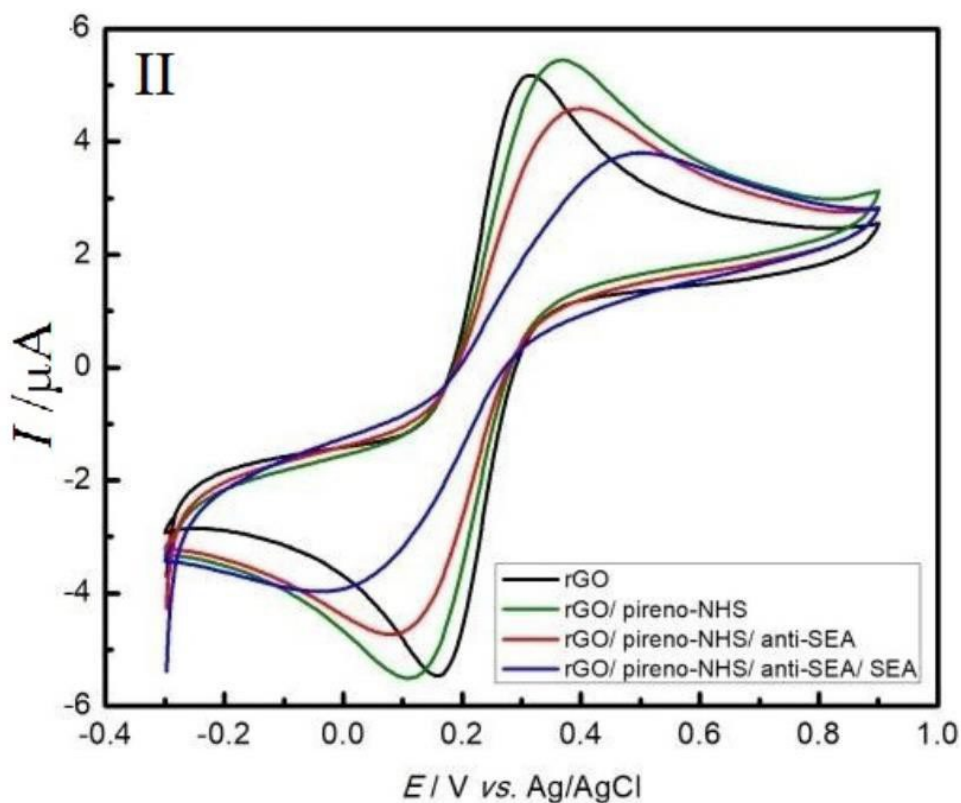
As Figuras 16 e 17 representam os voltamogramas do eletrodo GC modificado com rGO e com o agente de imobilização pireno-NHS. Os potenciais de oxidação e redução dos eletrodos modificados com rGO pireno-NHS, anti-SEA e SEA estão contidos na Tabela 3.

Figura 16- Caracterização CV do eletrodo (I) modificado com rGO e pireno-NHS



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Figura 17- Caracterização CV do eletrodo (II) modificado com rGO e pireno-NHS



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

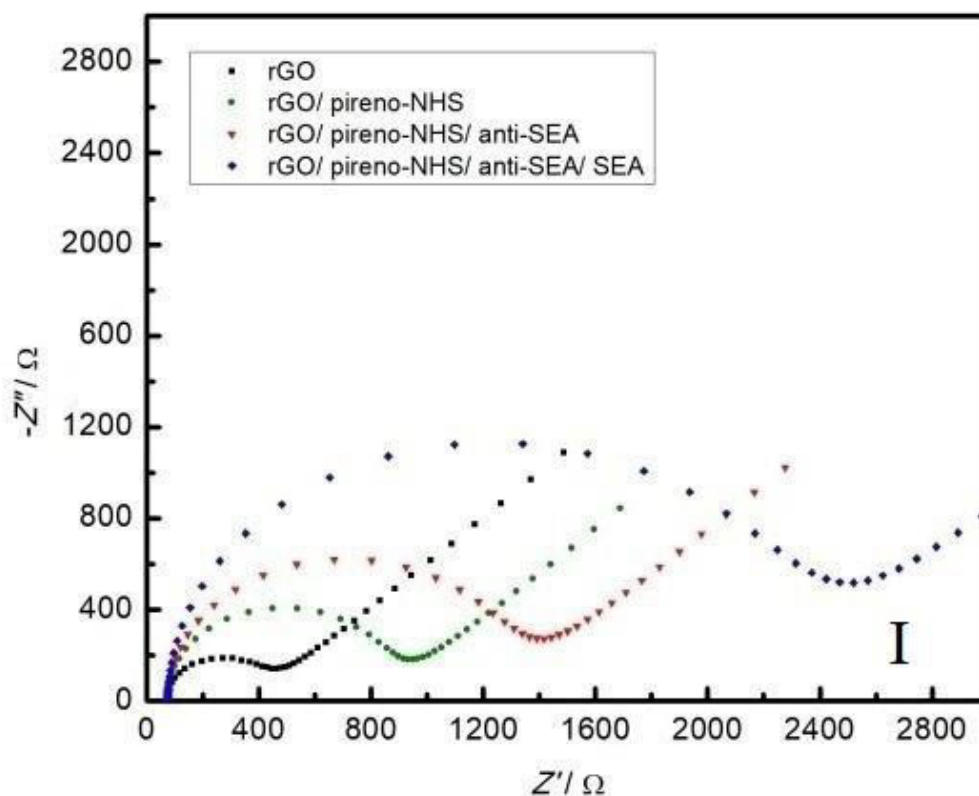
Tabela 3 - Potenciais de redução e oxidação dos eletrodos modificados com rGO, pireno-NHS, anti-SEA e SEA

Eletrodos	Oxidação (V)		Redução (V)	
	I	II	I	II
rGO	+0,32	+0,31	+0,15	+0,15
rGO/pireno-NHS	+0,36	+0,36	+0,11	+0,10
rGO/pireno-NHS/ anti-SEA	+0,40	+0,39	+0,07	+0,08
rGO/pireno- NHS/anti-SEA/SEA	+0,48	+0,49	-0,01	-0,04

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Nas Figuras 18 e 19 estão representados os Diagramas de Nyquist para a modificação dos eletrodos com rGO com pireno-NHS.

Figura 18- Diagrama de Nyquist do eletrodo I modificado com rGO e pireno-NHS

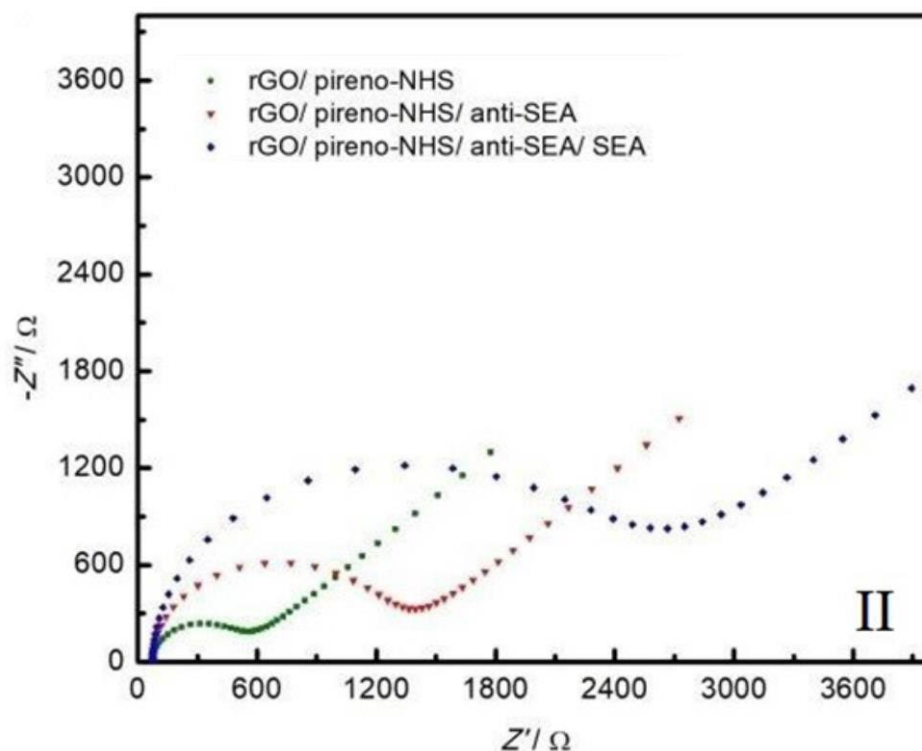


Legenda: para eletrodo modificado com rGO (■), modificado com pireno-NHS (●) presença do anticorpo (▼) e presença do antígeno (◆). No detalhe: intervalo de alta frequência e circuito elétrico equivalente em PBS 0,2 mol

L^{-1} pH 7,4, e em solução 0,1 mol L^{-1} KCl contendo 5,0 mmol L^{-1} do par redox $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Figura 19- Diagrama de Nyquist do eletrodo II modificado com rGO e pireno-NHS



Legenda: para eletrodo modificado com rGO (■), modificado com pireno-NHS (●) presença do anticorpo (▼) e presença do antígeno (◆). No detalhe: intervalo de alta frequência e circuito elétrico equivalente em PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 7,4, e em solução 0,1 mol L⁻¹ KCl contendo 5,0 mmol L⁻¹ do par redox [Fe (CN)₆]^{3- / 4-}

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Os valores de R_{ct} e R_s obtidos para os eletrodos de trabalho modificados com rGO e pireno-NHS estão representados na Tabela 4.

Tabela 4- - R_{ct} e R_s dos eletrodos modificados com rGO, pireno-NHS, anti-SEA e SEA

Eletrodos	R_{ct} (kΩ)		R_s (kΩ)	
	I	II	I	II
rGO	392,58	773,57	68,5	73,54
rGO/pireno-NHS	847,62	1012,5	67,16	81,35
rGO/pireno-NHS/ anti-SEA	1283	1284,3	70,03	68,65
rGO/pireno-NHS/anti- SEA/SEA	2336,5	2589,5	70,56	64,20

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

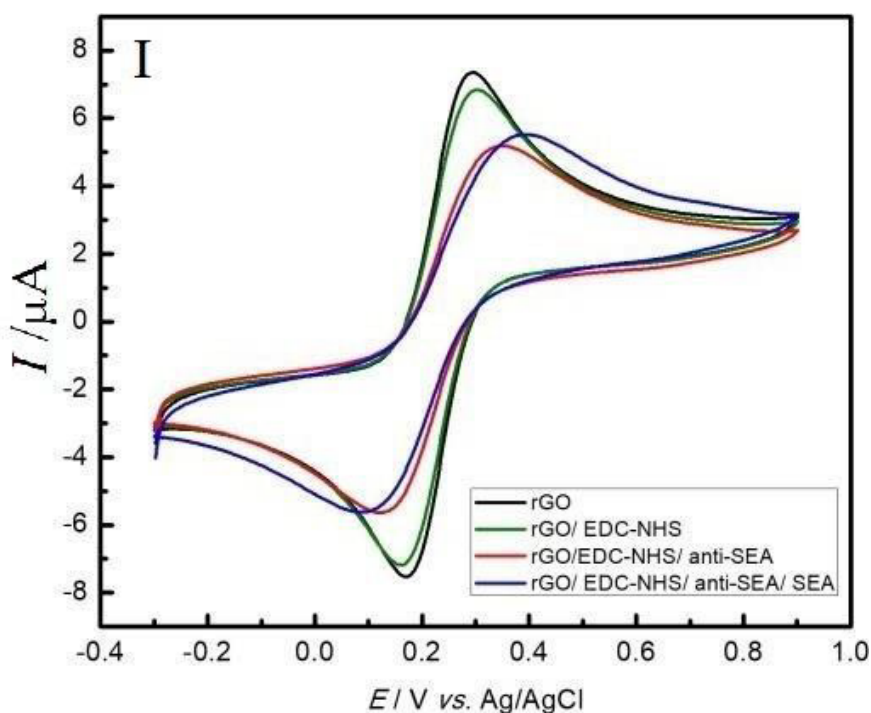
Observando os dados obtidos da medição de CV e de EIS para os eletrodos modificados com rGO e o agente de imobilização, pireno-NHS, nota-se que houve um aumento da resistência à transferência de carga e uma diminuição nas correntes de pico anódico e catódico à medida que o anticorpo e o antígeno eram adicionados na superfície dos eletrodos. Embora a caracterização eletroquímica tenha apresentado quando se utiliza o pireno-NHS, aumenta uma etapa no preparo do biossensor aumentando o tempo de análise. Além disso, aumenta o custo final do dispositivo proposto.

Portanto, se comparado com o método de imobilização utilizando somente o rGO, este ainda é a melhor alternativa para a imobilização do anticorpo anti-SEA.

4.5.3 Eletrodo GC modificado com rGO/EDC-NHS

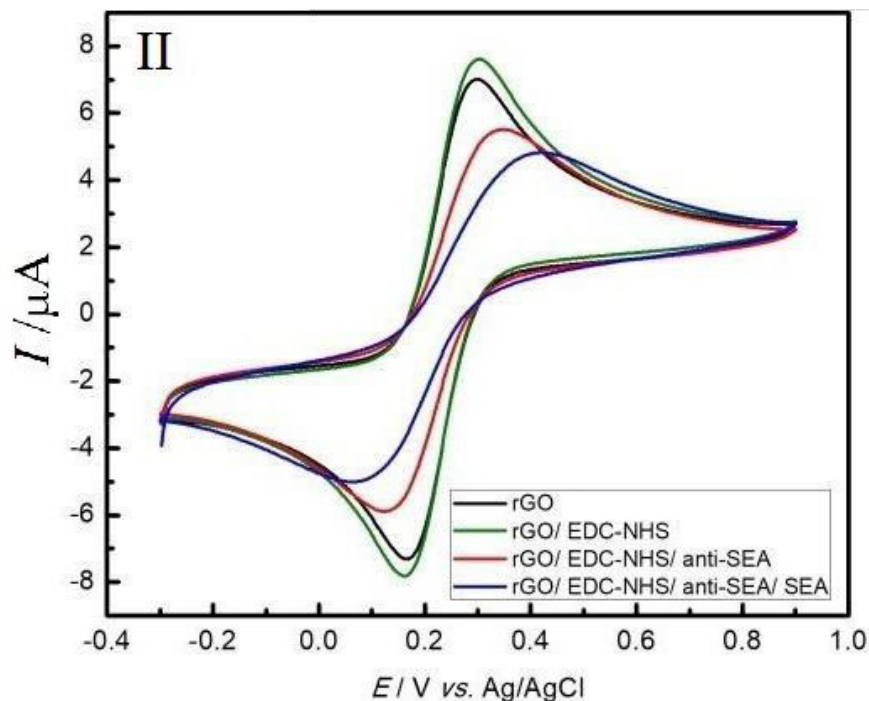
As Figuras 20 e 21 representam os voltamogramas dos eletrodos modificados com rGO e EDC- NHS. Na Tabela 5 estão contidos os potenciais de oxidação e redução dos eletrodos de acordo com as etapas de modificação. Observou-se discrepância das correntes de pico entre os dois eletrodos estudados (gráficos I e II), logo acredita-se que essa diferença foi originada possivelmente, pela instabilidade do EDC-NHS.

Figura 20- Caracterização CV para o eletrodo (I) modificado com rGO, EDC-NHS, anti-SEA e SEA



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Figura 21- Caracterização CV para o eletrodo (II) modificado com rGO, EDC-NHS, anti-SEA e SEA



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

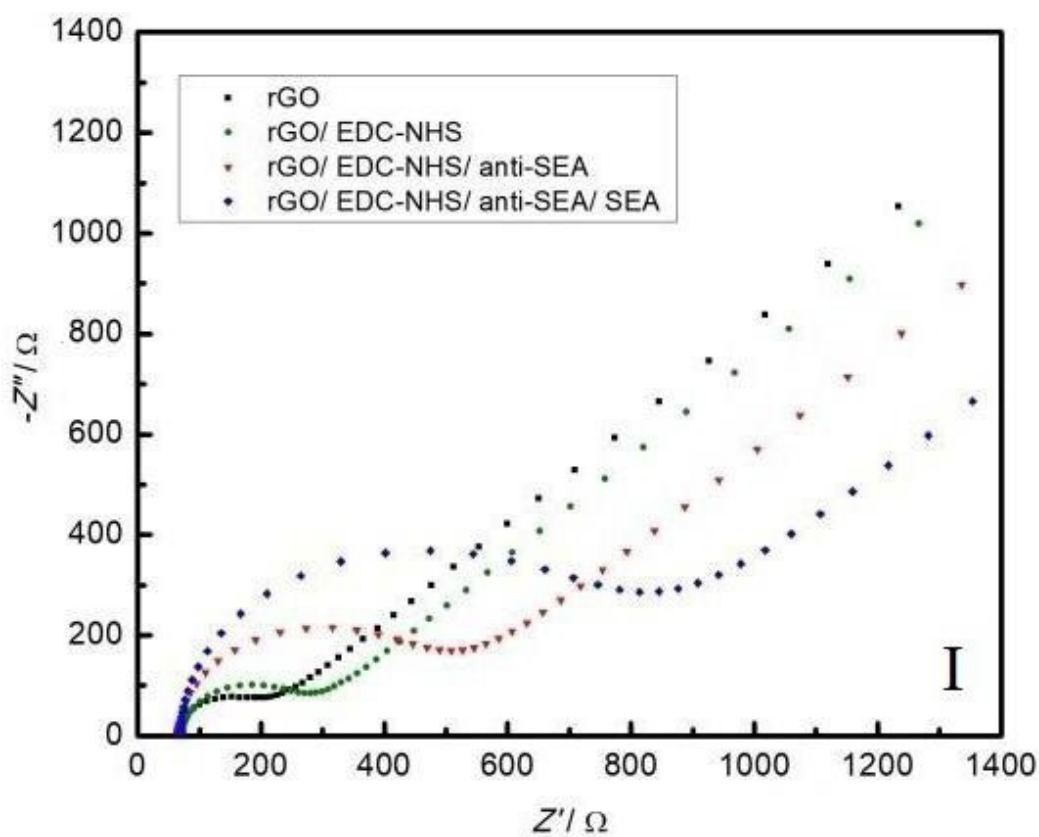
Tabela 5- Potenciais de redução e oxidação dos eletrodos modificados com rGO, anti-SEA e SEA

Eletrodos	Oxidação (V)		Redução (V)	
	I	II	I	II
rGO	+0,29	+0,29	+0,16	+0,16
rGO/EDC-NHS	+0,30	+0,30	+0,16	+0,16
rGO/EDC-NHS/anti-SEA	+0,33	+0,34	+0,12	+0,12
rGO/EDC-NHS/anti-SEA/SEA	+0,39	+0,41	+0,08	+0,06

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Na Figuras 22 e 23 estão representados os Diagramas de Nyquist para a modificação dos eletrodos com rGO e EDC/NHS.

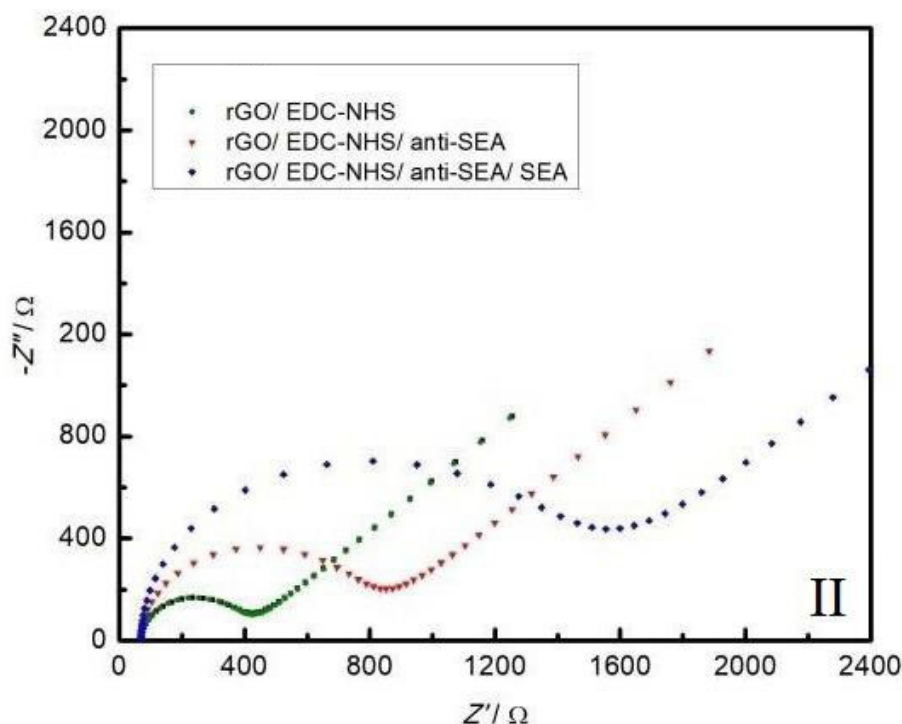
Figura 22- Diagrama de Nyquist do eletrodo I modificado com rGO e EDC-NHS



Legenda: eletrodo modificado com rGO quimicamente reduzido (■), modificado com EDC/NHS (●) presença do anticorpo (▼) e presença do antígeno (◆). No detalhe: intervalo de alta frequência e circuito elétrico equivalente em PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 7,4, e em solução 0,1 mol L⁻¹ KCl contendo 5,0 mmol L⁻¹ do par redox [Fe (CN)₆]^{3- / 4-}.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Figura 23- Diagrama de Nyquist do eletrodo II modificado com rGO e EDC-NHS



Legenda: eletrodo modificado com rGO quimicamente reduzido (■), modificado com EDC/NHS (●) presença do anticorpo (▼) e presença do antígeno (◆). No detalhe: intervalo de alta frequência e circuito elétrico equivalente em PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 7,4, e em solução 0,1 mol L⁻¹ KCl contendo 5,0 mmol L⁻¹ do par redox [Fe(CN)₆]^{3- / 4-}.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Os valores de R_{ct} e R_s obtidos para os eletrodos de trabalho modificados com rGO e EDC/NHS estão representados, respectivamente, na Tabela 6.

Tabela 6- R_{ct} e R_s dos eletrodos modificados com rGO termicamente reduzido, EDC-NHS, anti-SEA e SEA

Eletrodos	R_{ct} (kΩ)		R_s (kΩ)	
	I	II	I	II
rGO	167,68	357,93	62,47	68,88
rGO/EDC-NHS	216,34	348,14	72,17	69,76
rGO/EDC-NHS/ anti-SEA	458,36	755,03	64,87	67,97
rGO/EDC- NHS/anti-SEA/ SEA	775,25	1482,4	66,81	63,79

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Observando os dados obtidos da medição de CV, o gráfico do segundo eletrodo apresentou um perfil esperado, enquanto no primeiro eletrodo foi observado que essa diminuição da corrente de pico não foi satisfatória. Possivelmente essa mudança no perfil deu-se porque a imobilização do anticorpo na superfície não foi efetiva. Já para os estudos por EIS para os eletrodos modificados com rGO e o agente de imobilização, EDC-NHS, nota-se que houve um aumento na resistência da transferência de carga à medida que o anticorpo e o antígeno eram adicionados na superfície dos eletrodos.

Contudo, observa-se que os perfis apresentados pela modificação com o EDC- NHS não estão bem próximos à modificação com o rGO e também não são homogêneos. Essa mudança possivelmente decorre da instabilidade do NHS e de ligações inespecíficas do anticorpo e do antígeno, na superfície de imobilização. Portanto, quando se compara os três métodos de imobilização estudados para anticorpos anti-SEA, o método de adsorção utilizando somente o rGO foi o melhor e será estudado para aplicação do imunossensor proposto.

4.6 AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE ANTI-SEA EM RGO

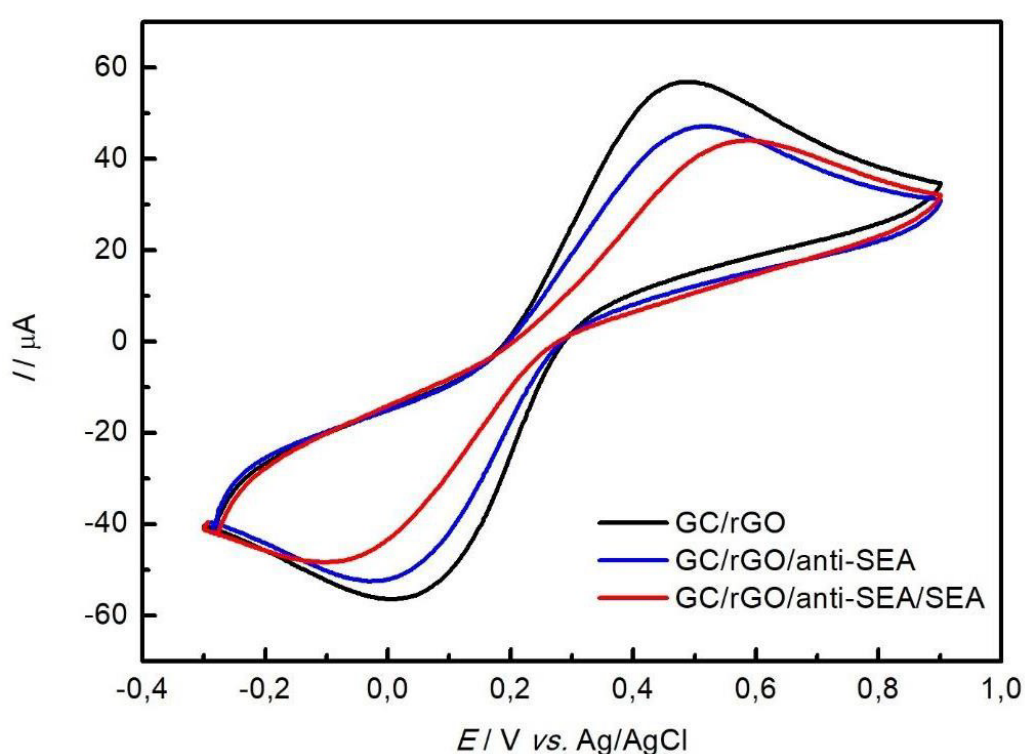
As análises de todos os gráficos e de todas as repetições realizadas no presente estudo demonstrou que o método de imobilização mais adequado para a construção do imunossensor foi da modificação com rGO. Por ser um método adsortivo, ou seja, sem o uso dos agentes de bioconjugação pireno-NHS e EDC-NHS, apresentou perfis mais homogêneos entre todas as caracterizações e menor influência das correntes capacitivas. Além disso, pela ausência de grupamentos como biotina-avidina e proteína A, que são moléculas que possuem um alto grau de afinidade com os anticorpos e são utilizados como agentes orientadores de imobilização, esta acaba sendo aleatória. Por isso, há diferença de sinais entre os eletrodos analisados.

Outra influência no processo de imobilização é a própria natureza de ligação dos grupamentos amina dos anticorpos, uma vez que tais grupamentos podem ocasionar ligações indesejadas, culminando na redução da atividade da biomolécula. Esse é um dos maiores desafios atrelados à construção de biossensores, já que é de suma importância a manutenção da atividade e estabilidade da biomolécula na superfície de imobilização.

Por fim, a utilização de BSA como agente bloqueador de sítios de ligação no rGO após a adição do anti-SEA é uma alternativa encontrada para reduzir possíveis ligações inespecíficas do antígeno, pois é necessário aumentar as chances de que a ligação anticorpo-antígeno seja efetivamente realizada.

Desse modo, para a etapa de avaliação da estabilidade do anticorpo na superfície e a construção do imunossensor para detecção de SEA em amostras de leite, foi utilizado apenas o rGO para modificação da superfície do eletrodo. Foi realizada novas caracterizações eletroquímicas por CV e EIS para a continuação do estudo, representadas pelas Figuras 24 e 25. Os valores de potenciais de oxidação e redução para CV e EIS estão presentes nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

Figura 24- - Caracterização CV para o eletrodo modificado com rGO



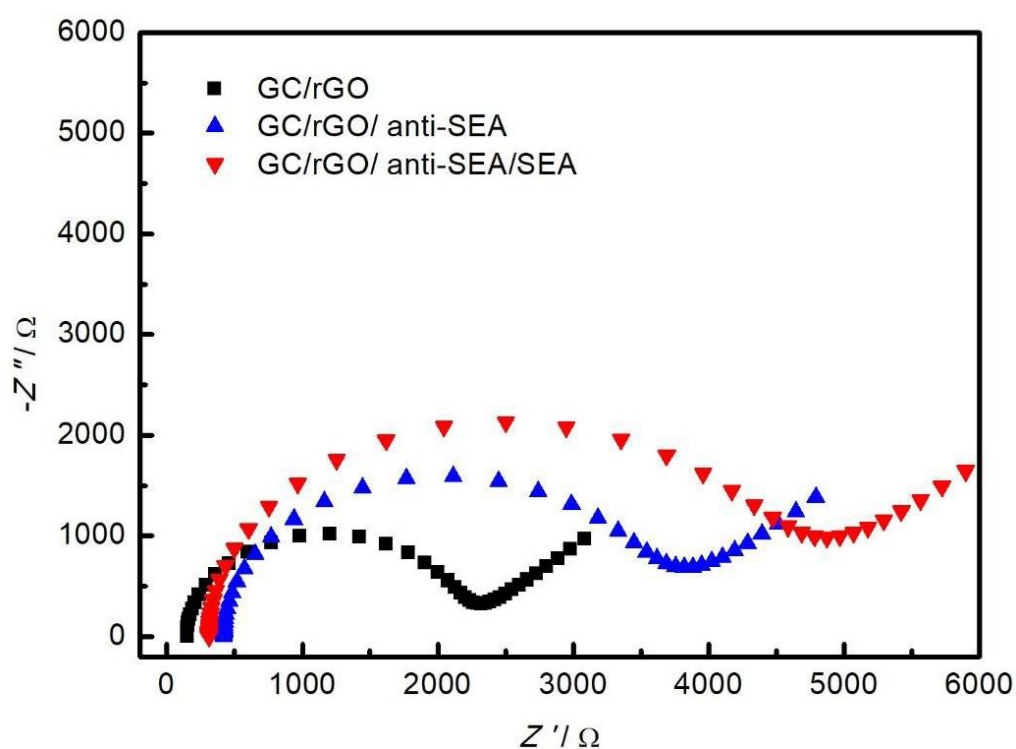
Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Tabela 7- Potenciais de redução e oxidação dos eletrodos modificados com rGO, anti-SEA e SEA

Eletrodo	Oxidação (V)	Redução (V)
rGO	+0,490	+0,007
rGO/ anti-SEA	+0,516	-0,031
rGO/anti-SEA/SEA	+0,587	-0,110

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Figura 25- Diagrama de Nyquist de eletrodo modificado com rGO



Legenda: eletrodo modificado com rGO (■), presença do anticorpo (▼) e presença do antígeno (♦). No detalhe: intervalo de alta frequência e circuito elétrico equivalente em PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 7,4, e em solução 0,1 mol L⁻¹ KCl contendo 5,0 mmol L⁻¹ do par redox [Fe (CN)₆]^{3- / 4-}.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Tabela 8 - R_{ct} e R_s dos eletrodos modificados com rGO quimicamente reduzido, anti-SEA e SEA

Eletrodo	R_{ct} (kΩ)	R_s (k Ω)
rGO	2,14	138
rGO/ anti-SEA	3,44	391
rGO/anti-SEA/SEA	6,43	234

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

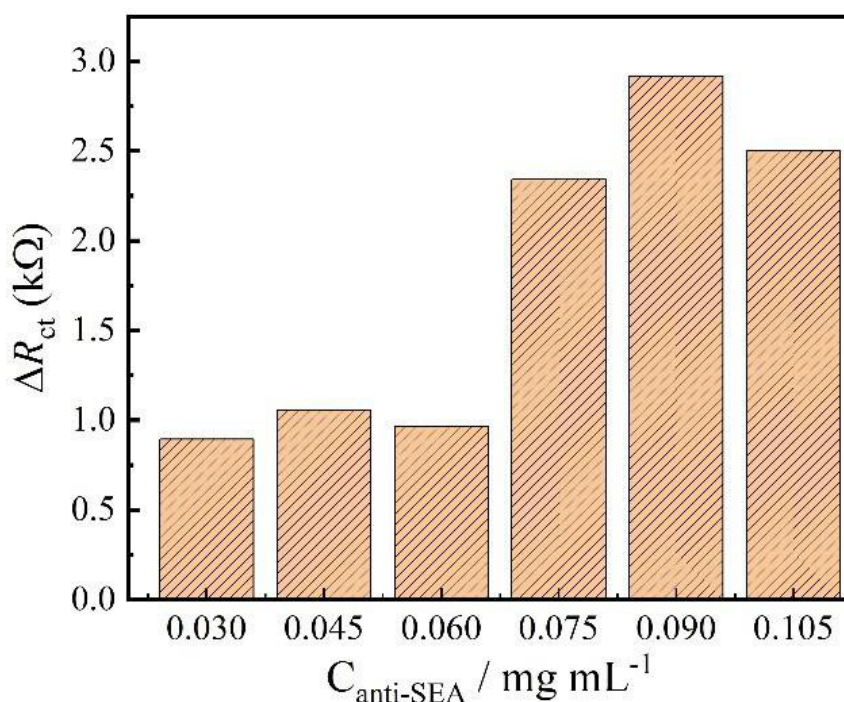
Pelos voltamogramas cíclicos pode-se observar uma diminuição no perfil de reversibilidade do sistema, com decréscimo sucessivo dos picos de oxidação e redução da espécie redox no final da etapa de imobilização e de ligação do antígeno ao anticorpo.

Já nos resultados obtidos pelo EIS, ocorreu o aumento sucessivo dos valores de R_{ct} no final das etapas de modificação. Por estes resultados, pode-se concluir que houve a imobilização do anti-SEA na superfície do eletrodo GC/rGO e que posteriormente ocorreu a ligação do antígeno da superfície do eletrodo GC/rGO/anti SEA.

4.7 ESTUDO DA ESTABILIDADE DO ANTICORPO SOB A SUPERFÍCIE DO ELETRODO APÓS MEDIDAS SUCESSIVAS DE EIS

Para verificar se a imobilização do anticorpo na superfície do eletrodo era estável frente a medidas sucessivas de EIS, foram realizadas cinco medições com diferentes concentrações de anticorpo. Desse modo, o eletrodo foi modificado até a etapa de adição do anticorpo anti-SEA, cuja concentração manteve-se constante (3,0 mg. L⁻¹). Os eletrodos foram lavados com água ultrapura entre as medições e incubados por 30 min em solução tampão 0,2 mol L⁻¹ PBS pH 7,4. Na Figura 26 está a relação entre a ΔR_{ct} e as concentrações de anticorpo, cujo gráfico demonstra o aumento da resistência, que atingiu seu pico quando a concentração de anti-SEA foi igual a 0.090 mg mL⁻¹

Figura 26- Relação entre a variação de R_{ct} e a concentração de anti-SEA

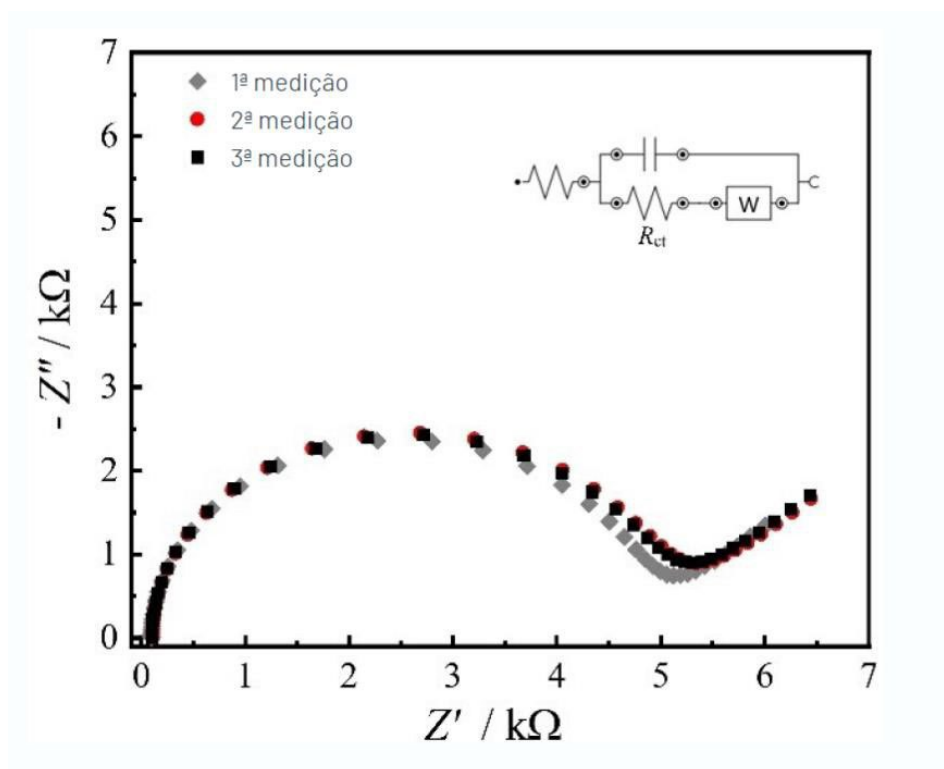


Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Na Figura 27 está representado o diagrama de *Nyquist* equivalente a medida realizada ao término do processo de imobilização após 3 medições sucessivas, respeitando o tempo de incubação de 30 min do eletrodo. Nota-se que a variação entre os valores foi mínima, indicando que os anticorpos permaneceram ligados ao GC/rGO mesmo após as medições demonstrando que a lixiviação de moléculas de anticorpo é muito baixa à medida que se faz as medições e lavagens do eletrodo.

Logo, a imobilização do anticorpo na superfície do eletrodo GC modificado com rGO é bastante estável, contribuindo para que imunossensor possa ser utilizado por várias horas. Os valores de R_{ct} obtidos variaram muito pouco, apresentando desvio padrão relativo de 4.61% (n=3) entre eles.

Figura 27- - Diagrama de Nyquist com medições sucessivas do anticorpo



Legenda: Primeira medição do eletrodo GC/rGO/anti-SEA (●) e Medição 3 do eletrodo GC/rGO/anti-SEA (■). No detalhe: intervalo de alta frequência e circuito elétrico equivalente em 0,1 mol L⁻¹ PBS pH 7,4, e em solução 0,1 mol L⁻¹ KCl contendo 5,0 mmol L⁻¹ do par redox [Fe(CN)₆]^{3-/4-}.

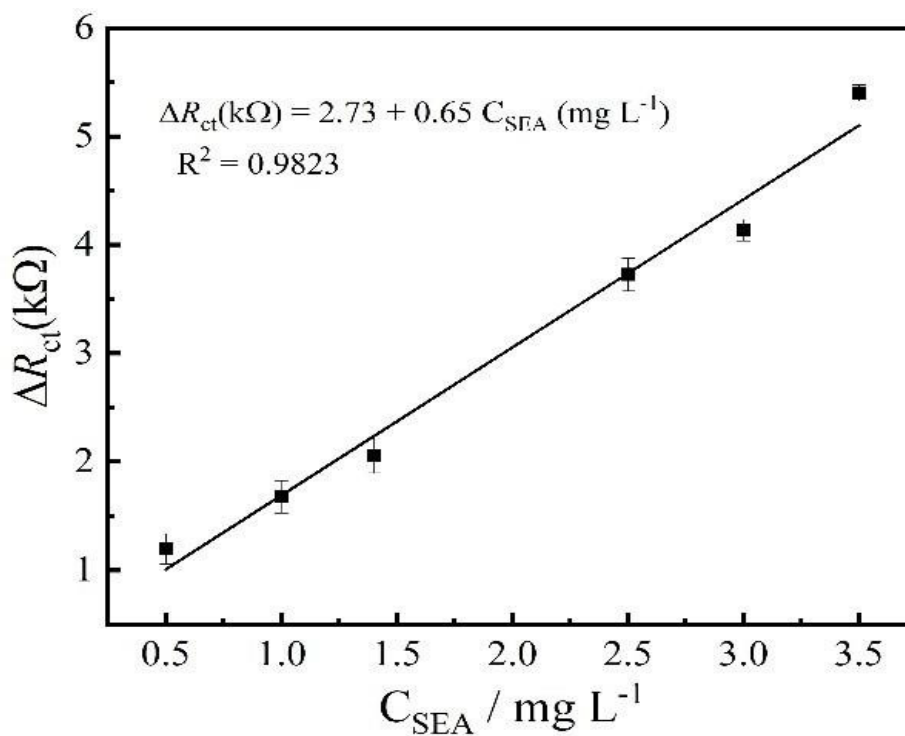
Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

4.8 CURVAS ANALÍTICAS DA ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA A

Por meio da análise da variação dos valores de R_{ct} obtidos pelas diferentes concentrações de SEA, o desempenho do imunossensor foi avaliado. O aumento proporcional de R_{ct} conforme o aumento da concentração de antígeno deve-se ao fato de que havia um maior número de moléculas de SEA ligadas aos anticorpos anti-SEA imobilizados no rGO, promovendo uma barreira cinética para a transferência eletrônica do par redox [Fe(CN)₆]^{3-/4-}.

A Figura 28 representa a curva de calibração construída para verificar a relação linear ($R^2 = 0,9823$) da resposta do imunossensor para detectar o antígeno SEA, em um intervalo de 0,5 a 3,5 mg mL⁻¹. Os valores do limite de detecção LD e o limite de quantificação LQ foram, respectivamente, de 0,102 µg mL⁻¹ e 0,330 µg mL⁻¹.

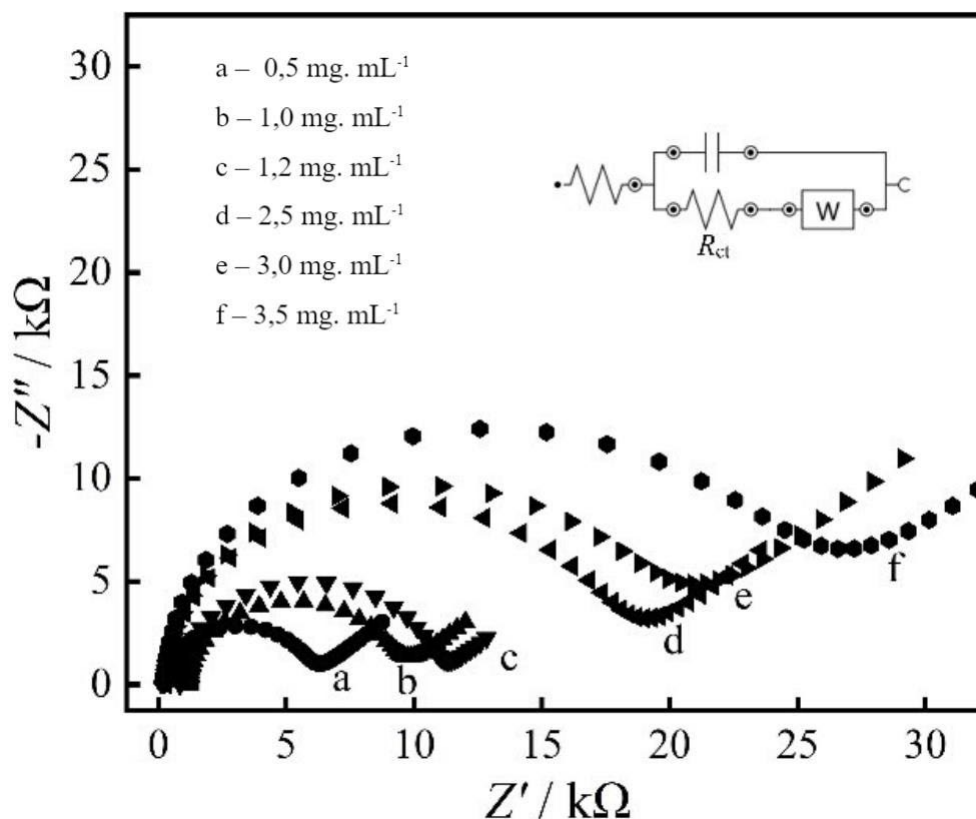
Figura 28- Gráfico de R_{ct} em função da concentração de SEA



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Os diagramas de *Nyquist* demonstram o efeito da concentração de SEA na resposta medida (Figura 18). Pode-se notar o aumento da resistência da transferência eletrônica com o aumento da concentração de SEA, logo, ocorre um aumento sucessivo no impedimento do par redox ao sofrer transferência eletrônica.

Figura 29- Diagramas de Nyquist para diferentes concentrações de SEA



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Com os resultados obtidos, considera-se que o imunossensor construído por esse projeto possui bom desempenho na detecção e quantificação de SEA, se comparado com os valores encontrados na literatura (Tabela 9). Deve-se levar em consideração que o imunossensor proposto utilizou-se de eletrodo de carbono vítreo modificado com rGO, enquanto outros biossensores para detectar SEs utilizaram-se de eletrodos de ouro modificados com substâncias como proteína A, glutaraldeído, EDC-NHS e cisteamina (PIMENTA-MARTINS, 2012), o que acrescenta custos e tempo de preparo do imunossensor.

Tabela 9 - Comparação dos limites de detecção entre biossensores para SEA

Metodologia	Materials	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Ref.
Imunossensor piezoelétrico	Eletrodos de Au/ cisteamina	0.020	SALMAIN (2011)
Imunossensor impedimétrico	GC/rGO	0.102	Este trabalho
Imunossensor amperométrico	Self-assembly monolayer em Eletrodos de Au	0.339	PIMENTA-MARTINS (2012)

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Segundo normativas da ANVISA (2019), o limite de detecção do método para enterotoxinas estafilocócicas em alimentos deve ser menor ou igual a 1 ng/ g. Comparando os valores obtidos por esta pesquisa juntamente com os resultados de outros trabalhos, ainda não foi possível atingir o limite de detecção estabelecido pela ANVISA. Porém, os resultados obtidos põem luz sobre possibilidades de melhoria para a performance do eletrodo

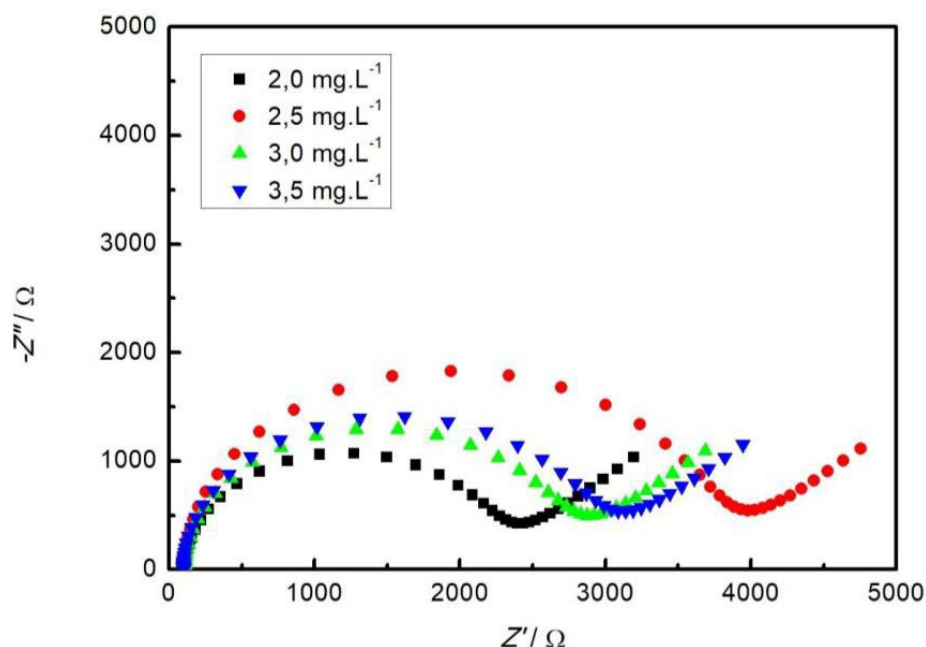
O desempenho do imunossensor desta pesquisa se comparado ao produzido por Pimenta-Martins et al. (2012), que utilizou eletrodos de Au e proteína A para detectar SEA em amostras de queijo, se mostrou vantajoso pelo fato de não empregar nenhuma substância adicional para auxiliar na imobilização dos anticorpos, assim como também explora a utilização do grafeno, nanomaterial que tem sido estudado para diversos fins, dentre eles para construção de biossensores.

4.9 APLICAÇÃO DO IMUNOSENSOR EM AMOSTRAS DE LEITE

O desempenho do imunossensor em amostras de leite foi avaliado pelo método de adição de padrão. Leite pasteurizado adquirido do comércio local foi diluído na proporção 1:100 em solução tampão 0,2 mol L⁻¹ PBS pH 7,4 e a amostra foi enriquecida com SEA na concentração de 2,0 mg L⁻¹. Após, foram adicionadas nas amostras três diferentes concentrações das soluções padrões de SEA, sendo estas 0,5 mg L⁻¹, 1,0 mg L⁻¹ e 1,5 mg L⁻¹.

Os eletrodos com anticorpos anti-SEA imobilizados foram incubados nessas alíquotas por 30 min em temperatura ambiente (20 °C). Medidas de EIS foram realizadas para determinar a resposta do imunossensor frente a essas amostras (Figura 30) e os resultados obtidos, bem como o erro relativo estão presentes na Tabela 10.

Figura 30- Diagramas de Nyquist para diferentes concentrações de SEA em amostras de leite



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Tabela 10 - Resposta do imunossensor em amostras de leite pasteurizado

Repetição	Adicionado (mg L^{-1})	Determinado (mg L^{-1})	Erro Relativo (%)
1	2,0	1,904	-4,791
2	2,0	2,054	2,693
3	2,0	2,165	8,250
Média $\pm$ SD		2,041 $\pm$ 0,131	

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

O erro relativo variou aproximadamente de -4,8 a 8,2%, apresentando um valor médio encontrado na curva de adição de padrão de 2,041 mg L^{-1} para uma adição de 2,0 mg L^{-1} . Possivelmente, os interferentes contidos no leite podem ter contribuído para esses valores, porém isso não invalida a performance do biossensor. A otimização do imunossensor deve ser realizada para futuras aplicações, sendo que o intervalo total entre o preparo do imunossensor e detecção do analito foi de aproximadamente 3 horas e 30 minutos.

5 CONCLUSÃO

A escolha do material de imobilização de biomoléculas influencia diretamente na performance dos biossensores desenvolvidos para as mais diversas aplicações. A imobilização de anticorpos em uma superfície modificada com óxido de grafeno reduzido, EDC/NHS e pireno-NHS foi avaliada para a construção de um imunossensor com o intuito de detectar a enterotoxina estafilocócica A (SEA) em amostras de leite

Na primeira parte desse projeto de pesquisa foi constatada que a imobilização do anticorpo anti-SEA na superfície dos eletrodos modificados apenas com rGO foi mais satisfatório do que nos eletrodos modificados com rGO/EDC/NHS e rGO/pireno-NHS. Trata-se de um resultado inédito, uma vez que ainda há uma baixa quantia de estudos de pesquisa científica envolvendo rGO e imobilização de SEA para construção de imunossensores.

Na segunda parte, o biossensor baseado em rGO para detecção de SEA apresentou um bom desempenho, mesmo sem a presença de agentes de imobilização. Do ponto de vista econômico e tecnológico, a redução de uma etapa na preparação do imunossensor implica em redução de custos e tempo de detecção. A estabilidade dos anticorpos imobilizados após medidas sucessivas de EIS foi avaliada, bem como a eficácia do imunossensor frente a amostras de leite contaminadas com SEA.

Considerando que o imunossensor construído nesse projeto utilizou-se de um material cujas propriedades são vantajosas para aplicações em biossensores e não utilizou-se de agentes de imobilização para auxiliar a permanência do anticorpo no eletrodo, é possível que a metodologia aqui empregada seja uma proposta viável para a detecção de SEA. Para que isso seja efetivado, outras análises devem ser realizadas, como a estabilidade de armazenamento do imunossensor após vários dias de preparo, aplicação em diferentes tipos de alimentos e comparação de seu desempenho frente a técnicas já estabelecidas, como ELISA. Além disso, a construção desse imunossensor em eletrodos portáteis de carbono é uma alternativa que deve ser explorada, visto que isso torna a proposta de aplicação do biossensor mais atrativa e viável.

Além disso, contribuiu também para a visibilidade Biotecnologia, uma vez que o emprego de nanomateriais e moléculas biológicas para a melhoria e/ou criação de processos, serviços e produtos é uma competência que esse profissional possui dada a multidisciplinariedade de sua profissão.

REFERÊNCIAS

- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Instrução Normativa nº 60, de 23 de Dezembro de 2019. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-60-de-23-de-dezembro-de-2019-235332356>>. Acesso em: 8 mar. 2023.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, London, v.61, p. 1-10, out. 2000.
- CHAUDHARY, K. et al. Protein immobilization on graphene oxide or reduced graphene oxide surface and their applications: Influence over activity, structural and thermal stability of protein. **Advanced in Colloid and Interface Science**, v. 289, jan. 2021.
- CINCOTTO, F.H et al. Graphene nanosheets and quantum dots: A smart material for electrochemical applications. **Chemistry European Journal**, v. 20, n. 16, p. 4746- 4753, 2014.
- CINCOTTO, F.H.; MORAES, F.C; MACHADO, S.A.S. Graphene nanosheets and quantum dots: a smart material for electrochemical applications. **Chemistry – A European Journal**, v. 20, p. 1-9, 2014.
- EMIRU, T. F.; AYELE, D.W. Controlled synthesis, characterization and reduction of graphene oxide: A convenient method for large scale production. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**, v.4, p. 74-79, 2017.
- FAGUNDES, H. et al. Occurrence of Staphylococcus aureus in raw milk produced in dairy farms in São Paulo state, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2, jun 2010.
- FATIBELLO FILHO, O.; CAPELATO, M.D. Biossensores. **Revista Química Nova**, São Paulo, v.15, n.1, p. 28- 39, 1992.
- FERRARI, A.C. et al. Raman spectrum of graphene and graphene layers. **Physical Review Letters**, v. 97, n. 18, 2006.
- FLORES, A. M. P. C.; MELO, C. B. Principais bactérias causadoras de doenças de origem alimentar. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Brasília, v.37, n.1, p. 65-72, 2015.
- GURUNATHAN, S. et al. Oxidative stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide in Pseudomonas aeruginosa. **International Journal of Nanomedicine**, v.7, p. 5901–5914, 2012
- HIRSCH, A. The era of carbon allotropes. **Nature Materials**, v. 9, p. 868-870, nov.2010
- JAEGFELDT, H. et al. Eletrochemical stability of catechols with a pyrene side chain strongly adsorbed on graphite electrodes for catalytic oxidation of dihydronicotinamide adenine dinucleotide, **Journal of the American Chemical Society**, v. 105, n. 7, p. 1805- 1814, 1983.
- JIA, F. Impedimetric aptasensor for Staphylococcus aureus based on nanocomposite prepared from reduced graphene oxide and gold nanoparticles. **Microchimica Acta**, v. 181, p. 967-974, 2014.
- KATZ, E. Application of bifunctional reagents for immobilization of proteins on a carbon

electrode surface: oriented immobilization of photosynthetic reaction centers, **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 365, n. 1-2, p. 157-164, 1994.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. Staphylococcus aureus and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.2, n. 1, p. 63-76, mar. 2003.

LI, D. et al. Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets. **Nature Nanotechnology**, v. 3, p. 101-105, 2008.

LOBO, A. O. et al. Caracterização de materiais carbonosos por espectroscopia Raman. **Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo**, v. 24, n. 2, p. 98-103, 2005.

LOH, K.P. et al., The chemistry of graphene. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, p. 2277-2289, jan. 2010.

MELO, A. M. A. et al. Eletrochemical immunosensors for Salmonella detection in food. **Journal of Applied Microbiology**, Berlin, v.100, n.12, p. 5301-5312, jun. 2016.

MOREIRA, C. S. et al. Biosensores: tecnologia e aplicações. Disponível em: <<http://www.biologia.seed.pr.gov.br/arquivos/File/biotecnologia/biosensores.pdf>>. Acesso em: 01 abr. 2020

NODOUSHAN, S. M. et al. Detection of Staphylococcal Enterotoxin A (SEA) using a sensitive nanomaterial-based electrochemical aptasensor. **Diamond and Related Materials**, v. 127, ago. 2022.

OLIVEIRA, C. M. B. et al. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.61, n. 2, p. 255-265, 2011.

PEI, S.; CHENG, H. M. The reduction of graphene oxide. **Carbon** 50, p. 3210-3228, 2012.

PIMENTA-MARTINS, M. G. R. et al. Development of an amperometric immunosensor for detection of staphylococcal enterotoxin type A in cheese. **Journal of Microbiological Methods**, v. 91, p.138-143, 2012.

PINCHUK, I. V; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. Staphylococcal enterotoxins. **Toxins**, Basel, v.2, p. 2177-2197, ago. 2010.

RICCI, F.; ADORNETTO, G.; PALLESCHI, G. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. **Electrochimica Acta**, v. 84, n.1, p. 74-83, dez. 2012.

ROCHA, C. G. Desenvolvimento de imunossensor impedimétrico para detecção do corante disperso Red 1. 2014. 110 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, 2014.

ROKMANA, A.W. et al. The optical properties of thin film reduced graphene oxide/poly (3,4 ethylenedioxythiophene):poly (styrene sulfonate)(PEDOT:PSS) fabricated by spin coating. **IOP Conf. Series: Journal of Physics**, 1011, 012007. 2018.

ROWLEY-NEALE, S. J. et al. An overview of recent applications of reduced graphene oxide as a basis of electroanalytical sensing platforms. **Applied Materials Today**, v. 10, p. 218-226, 2018.

- SALMAIN, M. et al. Piezoelectric immunosensor for direct and rapid detection of staphylococcal enterotoxin A (SEA) at the ng level. **Biosens. Bioelectron.** v 29, p.140–144, 2011.
- SHARMA, S.; BYRNE, H.; O’KENNEDY, R. J. Antibodies and antibody-derived analytical biosensors. **Essays in Biochemistry**, v. 60, p. 9-18, jun. 2016.
- SILVA, M. K. L. et al. Determination of carbamate pesticide in food using a biosensor based on reduced graphene oxide and acetylcholinesterase enzyme, **Sensors Actuators, B Chem.** 277 (2018) 555–561. doi:10.1016/j.snb.2018.09.051.
- SILVA, M.K.L; SIMÕES, R. P.; CESARINO, I. Evaluation of Reduced Graphene Oxide Modified with Antimony and Copper Nanoparticles for Levofloxacin Oxidation, **Electroanalysis**. 30 (2018) 2066–2076. doi:10.1002/elan.201800265.
- SILVA FILHO, J.C. Síntese, caracterização e aplicação do óxido de grafeno reduzido como agente de moagem na preparação de pós TR-Fe-B. 2020. 94p. Dissertação (mestrado) – INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo, 2020.
- STYLIANAKIS, M. M. et al. Updating the role of reduced graphene oxide ink on field emission devices in synergy with charger transfer materials. **Nanomaterials**, v. 9, n.2, jan. 2019.
- TARCAN, R. et al. Reduced graphene oxide today. **Journal of Materials Chemistry C**, v.8, n. 1198, set. 2019.
- TORRES, H.S., BONILLA, J.L. L. Aspectos quirales del grafeno. **Revista Chilena de Ingeniería**, v. 19, n.1, p. 67-75, 2011.
- VASHIST, S. K.; LUONG, J. H. T. Antibody immobilization and surface functionalization chemistries for immunodiagnosics. In: (org.) **Handbook of Immunoassay Technologies: Approaches, performances, and Applications**. Cambridge: Academic Press, 2018, p. 19-46.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Foodborne disease outbreaks: guidelines for investigation and control. Geneva. 2008. 146 p.
- WU, S. et al. A review of the methods for detection Staphylococcus aureus enterotoxins. **Toxins**, Basel, v. 8, n. 7, p. 176, jun. 2016.
- YU, W. et al. Progress in the functional modification of graphene/graphene oxide: a review. **RSC Advances**, v.10, p. 15328-15345, mar. 2020.
- ZACCARIOTTO, G.; SILVA, M. K. L.; ROCHA, G. S.; CESARINO, I. A Novel Method for the Detection of SARS-CoV-2 Based on Graphene-Impedimetric Immunosensor, **Materials**, v.14, n. 4230, jul. 2021.